

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Hanna Rein

Narkolepsia kui komplekshaiguse geneetilised aspektid

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc Maris Teder-Laving
MD, PhD Andres Metspalu

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Narkolepsia üldisloomustus.....	7
1.2. Epidemioloogia	7
1.3. Narkolepsia sümptomid.....	8
1.3.1. Päevane liigunisuus	8
1.3.2. Katapleksia.....	8
1.3.3. Hüpnagoogilised hallutsinatsioonid ja uneparalüüs	9
1.4. Diagnoosimine	10
1.4.1. Objektiivsed meetodid EDS-i hindamiseks.....	10
1.4.2. Subjektiivsed meetodid EDS-i hindamiseks	10
1.4.3. HLA genotüpiseerimine	11
1.5. Narkolepsia tekkepõhjused	11
1.5.1. Hüpokretiini defitsiit seljaaju vedelikus.....	12
1.5.2. HLA DQB1*0602	12
1.5.3. HLA regiooni väliste narkolepsiaga seost näitavate polümorfismide leidmine GWAS uuringutega.....	13
1.5.3.1. Narkolepsiaseoseline marker TCRA lookuses	14
1.5.3.2. Narkolepsiaseoseline marker P2RY11 lookuses	14
1.5.3.3. ImmunoChip uuringud	15
1.5.3.4. HLA marker rs2858884 ja protektiivsed HLA alleelid	16
1.6. Narkolepsia kui autoimmuunhaigus	16
1.7. Ravi	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. Valim.....	21
2.2.2. Uuritavate geenide amplifitseerimine ning genotüpiseerimine	21
2.2.3. PCR produktide sekveneerimine	24
2.3. Tulemused ja arutelu	25
2.3.1. Narkolepsia patsientide fenotüüp	25
2.3.2. Narkolepsiaseoseliste riskialleelide ning HLA DQB1*0602 markeri esinemine narkolepsia diagnoosiga geenidoonoritel	26

2.3.3. Geneetiliste markerite kandlus tervetel doonoritel.....	28
KOKKUVÕTE.....	31
SUMMARY	32
TÄNUSÕNAD.....	34
KIRJANDUSE LOETELU	35
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	40
LISAD	41
Lisa 1.....	41
Lisa 2.....	42
Lisa 3.....	43
LIHTLITSENTS	44

KASUTATUD LÜHENDID

anti-TRIB2	<i>autoantibody against Tribbles homolog 2</i> , Tribbles homoloog 2 vastane autoantikeha
bp	<i>base pair</i> , aluspaar
CI	<i>confidence intervall</i> , usaldusintervall
APC	<i>antigen presenting cells</i> , antigeeni esitlev rakk
ASO	<i>anti-streptolysin O</i> , streptolüsiin O vastane antikeha
BBB	<i>blood-brain barrier</i> , hematoentsefaalbarjäär
BMI	<i>body mass index</i> , kehamassindeks
CACNA1C	<i>calcium channel voltage-dependent L-type alpha 1C</i> , geen
CHKB	<i>choline kinase beta</i> , geen
CPT1B	<i>carnitine palmitoyltransferase 1B</i> , geen
CNS	<i>central nervous system</i> , kesknärvisüsteem
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , seljaajuvedelik
CTSH	<i>cathepsin H</i> , geen
DAD1	<i>defender against cell death 1</i> , geen
DNMT1	<i>DNA-methyltransferase 1</i> , geen
EDS	<i>excessive daytime sleepiness</i> , päevane liigunisuus
FAM3D	<i>family with sequence similarity 3, member D</i> , geen
GWAS	<i>genome-wide association study</i> , ülegenoomne assotsiatsiooniuuring
HCRTR2	<i>hypocretin receptor 2</i> , geen
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , inimese leukotsütaarne antigeen
H1N1	seagripiviirus
IFN- γ	<i>interferon-γ</i> , interferoon- γ
IL-2	<i>interleukin-2</i> , interleukiin-2
MAF	<i>minor allele frequency</i> , minoorse alleeli sagedus
MCH	<i>melanin-concentrating hormone</i> , melaniini kontsentreeriv hormoon
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i> , inimese koesobivuskompleks II

MSLT	<i>multiple sleep latency test</i> , unelatentsuse test
NFATC2	<i>nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i> , geen
NK	<i>natural killer</i> , looduslik tapja-T-rakk
OR	<i>odds ratio</i> , šansside suhe
P2RY11	<i>purinergic receptor P2Y</i> , purinergiline retseptorgeen P2Y
POLE	<i>polymerase (DNA directed)</i> , <i>epsilon</i> , geen
REM	<i>rapid eye movement</i> , kiirete silmaliigutustega unefaas
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , ühenukleotiidne polümorfism
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-raku antigeenne retseptor
TCRA	<i>T-cell receptor alfa</i> , T-raku antigeense retseptori alfa lookus
Th1	<i>T-helper cells</i> , T-abistaja rakk
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i> , tuumor nekroosi faktor alfa
TNFRSF4	alias <i>OX40</i> alias <i>CD134</i> , <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4</i> , geen
TNFSF4	alias <i>OX40L</i> alias <i>CD134L</i> , <i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4</i> , geen
TRIB2	<i>Tribbles homolog 2</i> , valk
SCP2	<i>sterol carrier protein 2</i> , geen
SOREMP	<i>sleep onset REM period</i> , unealguse REM periood

SISSEJUHATUS

Narkolepsia – neuroloogiline unehäire, mida üldiselt tuntakse kui ootamatute ning vastupandamatute unesööstude esinemist päevasel ajal. Ometigi ei ole päevane liigunisus ainus sümptom, mis konkreetset terviseriket kirjeldab, kuna antud diagnoosiga inimesi vaevavad ka tugevatest emotsioonidest põhjustatud lihasnõrkushood, hüpnagoogilised hallutsinatsioonid ning uneparalüüs.

Narkolepsiat peetakse pigem aladiagnoositud haiguseks, kuna sümptomite avaldumine ja raskusaste varieeruvad ning esimestest sümptomitest võib diagnoosini viiva spetsiaalse uneuuringuni kuluda isegi aastaid. Sümptomid, mis enamasti saavad alguse teisel aastakümnel, ei kurna üksnes organismi, vaid mõjutavad ka igapäevast elukvaliteeti.

Konkreetset narkolepsia tekkepõhjust ei ole veel väljaselgitatud, kuid on teada, et haigust kirjeldab hüpokretiini tootvate neuronite hävimine ajus. Püstitatud, kuid tõestamata hüpoteesi kohaselt võivad narkolepsia avaldumisele viivad protsessid olla autoimmuunse taustaga. Hüpoteesi toetab ka fakt, et eelsoodumuseks narkolepsiasse haigestumisel on kindla HLA markeri (*DQB1*0602*) kandlus ning teadaolevalt on autoimmuunhaigustele iseloomulik seotus spetsiifiliste HLA alleelidega. Lisaks sellele on ülegenoomsetel assotsiatsiooniuuringutel leitud ka teisi SNP-markereid, mis viitavad autoimmuunsele protsessile narkolepsia arengus.

Käesoleva töö teoreetilise osa eesmärgiks on anda ülevaade narkolepsiast kui haigusest ja selle geneetilisest taustast. Eksperimentaalselt ülesandeks on uurida mõnede suuremat geneetilist riski omavate narkolepsiaseoselistele alleelide esinemist Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu andmebaasis olevatel narkolepsia diagnoosiga isikutel ja normpopulatsiooni esindavatel geenidoonoritel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Narkolepsia üldisloomustus

Narkolepsia on neuroloogiline haigus, mida iseloomustab krooniline unisus ning sporaadilised unemustrid (Mahlios jt., 2013; Burgess ja Scammell, 2012). Narkolepsia puhul ei suuda aju normaalselt reguleerida une-ärkveloleku tsükleid¹. Antud unehäire avaldab mõju igapäevastele tegevustele ning üldisele elukvaliteedile, sealhulgas inimeste omavahelistele suhetele, õppimisvõimele ning töövõimalustele (Peacock ja Benca, 2010).

Esimesed veenvad kirjeldused narkolepsia kohta pärinevad Saksamaalt aastast 1877, mil Karl Friedrich Otto Westphal kirjeldas esmakordselt narkolepsiale ainuomast sümptomit – katapleksi. Termin „narkolepsia“ võttis kasutusele prantslane Jean Baptiste Édouard Gélinau 1880. aastal, kombineerides omavahel kreekakeelseid sõnu νάρκη (*narkē* ehk kangestus) ja λήψις (*lepsis* ehk atakk, Schenck jt., 2007).

1.2. Epidemioloogia

Narkolepsia mõjutab Euroopa populatsioonides hinnanguliselt 25-50 indiviidi 100 000 elaniku kohta (Longstreth jt., 2007). Uute narkolepsiajuhtude sagedus aastas 100 000 inimese kohta on hinnanguliselt 0,74-1,37 (Silber jt., 2002). Üldlevinud arvamuse kohaselt on narkolepsia aladiagnoositud terviserike ning levimuse hinnangute varieeruvust võivad põhjustada mitmed tegurid: uuringute ülesehitus, konkreetne seisundi määratlemine ning vaatlustesse kaasatud inimeste vanus (Peacock ja Benca, 2010).

Võrreldes erinevaid etnilisi gruppe, võib näha sarnasusi sümptomites, haiguse esmase ilmnemise vanuses ning raskusastmes (Okun jt., 2002). Kõige esimesed narkolepsiale viitavad tunnused ilmnevad tavaliselt nooruki- või varajases täiskasvanueas (15-29 eluaastat), vanuse kasvades haigestumise oht väheneb (Silber jt., 2002; Morrish jt., 2004). Ülejäänud sümptomite avaldumine toimub järk-järgult ning inimeste vaheline varieeruvus on suur (Longstreth jt., 2007). Ajavahemik esmase sümptomi ning diagnoosi kinnitamise vahel on keskmiselt 15 aastat, ulatudes äärmuslikemal juhtudel isegi kuni 61 aastani (Morrish jt., 2004).

On leitud, et inimese haigestumisel narkolepsiasse omab tähtsust see, mis kuul ta sündinud on. Erinevate uuringute andmeil on enim narkoleptikuid sündinud märtsis (sõltumata soost ja

¹http://www.ninds.nih.gov/disorders/narcolepsy/detail_narcolepsy.htm

sünniaastast) ning kõige vähem antud haigusega inimesi on sündinud septembris. Narkolepsiasse haigestumise risk märtsis sündides on põhimõtteliselt kahekordistunud võrreldes sündimistega muudes kalendrikuudes ning antud fenomeni kutsutakse „märtsikuu sünniefektiks“ (*“March birth Effect”*). Võimalikeks põhjusteks võivad olla keskkonnategurid sünnieelsel ning vastsündinu perioodil, mis mõjutavad lapse hilisemat narkolepsiasse haigestumise riski (Dauvilliers jt., 2003; Picchioni jt., 2004).

1.3. Narkolepsia sümptomid

Klassikaline kliiniline narkolepsia sündroom koosneb sümptomite kombinatsioonist, mis sisaldab päevast liigunisust (EDS), katapleksi, hüpnagoogilisi hallutsinatsioone ja uneparalüüsi (Overeem jt., 2008). Sümptomite esinemise sagedus ning intensiivsus on varieeruvad ning ainult umbes 10% kõikidest patsientidest esineb korraga kogu sümptomite tetraad (Morrish jt., 2004). Täiendavalt on leitud, et haigusnähud süvenevad esimese paari aasta jooksul ning seejärel säilivad muutumatuna (Okun jt., 2002).

1.3.1. Päevane liigunisus

Esmane ja põhiline sümptom, mida narkolepsia puhul tavaliselt täheldatakse, on päevane liigunisus (Kadotani jt., 1998). EDS avaldub korduvate ettearvamatute sügavate unesööstadena, mis võivad inimest tabada nii rahulikus olekus (filmide vaatamine, loengutes osalemine) kui ka mõne aktiivse tegevuse ajal, näiteks auto juhtimine, söömine või ärikohtumine (AASM, 2001).

„Unesööstude“ kestused varieeruvad. Eristatakse väga lühikesi perioode (*microsleeps*), mil tähelepanu muutub hetkeks lünklikuks ning esinevad meeleolumuutused ja pikemaid, mis jäävad vahemikku 10-20 minutit. Üldiselt kestavad episoodilised uinakud alla tunni, pärast mida ärkab narkolepsiahaige patsient värskema enesetundega. Mõne aja möödudes, tavaliselt paari-kolme tunni pärast, võtab väsimus jälle võimust ning muster kordub taas. Lisaks võivad päevased uinakud häirida täisväärtuslikku ööund, muutes selle killustunuks (Dauvilliers jt., 2007; AASM, 2001). Küll on teada, et ööpäevase une koguhulgalt narkoleptikud ei erine tervetest inimestest¹.

1.3.2. Katapleksia

EDS ei ole narkolepsiale spetsiifiline sümptom, kuna seda võib esineda ka teiste unehäirete korral (Boulos ja Murray, 2010). Katapleksia, mis on ainuomane narkolepsiat põdevatele inimestele, tähendab tugevate emotsioonide (naer, viha, üllatus) poolt esilekutsutud äkilist

lihastoonuse kadu (Overeem jt., 2011). Kataplektiline atakk võib haarata kõiki vöötlihased (v.a. diafragma), põhjustades inimese kollabreerumist või piirduda näiteks pea rinnale vajumisega, näolihaste lõtvumisega, ebaselge kõnega või põlvede nõrkusega. Lühikest aega, kuni kaks minutit kestva lihasnõrkuse korral teadvus ja hingamine säilivad ning mälu ei mõjutata (AASM, 2001).

Narkoleptikud on jaotatud põhimõtteliselt kahte gruppi: esimesse rühma kuuluvad need, kel esineb narkolepsia koos katapleksiaga (~80% haigestunutest²) ning teise need, keda vaevab üksnes narkolepsia ilma katapleksiata (Nishino jt., 2000a). Katapleksia hoogude esinemise sagedus näitab indiviidide ja antud haiguse vormide vahelisi erinevusi. Osadel inimestel võivad lihasnõrkushood aasta jooksul ette tulla harva, samal ajal kui teistel patsientidel esineb neid mitu korda ühe päeva jooksul (Dauvilliers jt., 2007).

1.3.3. Hüpnagoogilised hallutsinatsioonid ja uneparalüüs

Hüpnagoogilised hallutsinatsioonid on erksad, sageli hirmutavad ning õudsed kogemused, mis esinevad uinumise algfaasis. Tihti tajutakse realistlikult kellegi või millegi kohalolekut, lisaks võivad esineda akustilised või visuaalsed hallutsinatsioonid. Isegi haigusest teadlikel patsientidel on mõnikord raske eristada hüpnagoogilisi hallutsinatsioone reaalsusest (Dauvilliers jt., 2007).

Uneparalüüs on mööduv üldine võimetus liigutada või rääkida uinumise või ärkamise hetkel. Lihaskontroll taastub patsientidel iseeneslikult või mõne välise stiimuli mõjul lühikese aja jooksul (Dauvilliers jt., 2007). Uneparalüüs on hirmutav kogemus, eriti selle esmakordsel läbi elamisel, millega kaasneb sageli tunne, et ei suudeta hingata. Episoodid ilmnevad enamasti koos hüpnagoogiliste hallutsinatsioonidega ja see intensiivistab hirmsaid emotsionaalseid elamusi veelgi. Uneparalüüs ei ole ainult narkolepsiale spetsiifiline sümptom, see võib esineda isoleeritud vormina ka muidu tervetel inimestel (AASM, 2001).

Lisaks eelpool mainitud neljale põhisümptomile, võib narkoleptikuid tabada ka mälukaotus või automaatne käitumine, täheldatud on silmalaugude allavajumist, ähmast või topelt nägemist (Dauvilliers jt., 2007; AASM, 2001). Veelgi enam, on selgunud, et narkoleptikud kalduvad olema pigem ülekaalulised ning ka ainevahetus on aeglasem kui võrreldavatel kontrolligrupi indiviididel (Chabas jt., 2007). Luca ja kolleegide poolt läbi viidud uuringust, kus osales 903 narkolepsiahaiget, olid umbes 2/3 patsientidest ülekaalulised (Luca jt., 2013).

²<http://www3.unil.ch/wpmu/eunn/about-narcolepsy/what-are-the-symptoms-of-narcolepsy/>

1.4. Diagnoosimine

Narkolepsia diagnoosimine on keeruline ning õige diagnoosi määramiseks tuleb uurida perekondlikku tausta, viia läbi polüsomnograafilised uuringud, kaasaarvatud une latentsuse test (MSLT) ja mõõta hüpokretiini taset seljaaju vedelikus (CSF, madal või olematu tase viitab narkolepsia-katapleksia esinemisele). EDS-i kui kõige konstantsema narkolepsia sümptomi raskusastme hindamiseks on võimalik kasutada nii objektiivseid kui ka subjektiivseid meetodeid (Akintomide ja Rickards, 2011).

1.4.1. Objektiivsed meetodid EDS-i hindamiseks

Objektiivse meetodina kasutatakse polüsomnograafilist ööune uuringut ning sellele järgnevat päevase unisuse hindamist MSLT abil. Viimasega saab mõõta une latentsi ehk aega, mis kulub magamajäämiseks ja mille keskmine pikkus narkoleptikutel on tavaliselt väiksem kui 8 minutit. Teiseks iseloomustab narkoleptikute päevaunemustrit SOREM perioodi esinemine, mis tähendab, et 15 minuti jooksul pärast uinumist algab niinimetatud kiire ehk REM unefaas. Tervete inimeste unetsükkel algab reeglina aeglase unefaasiga ja lõpeb REM unega. Diagnostilise tähtsusega on SOREM perioodi esinemine vähemalt kahel korral testpäeva jooksul patsientidele pakutud viiest võimalusest uinuda (Peacock ja Benca, 2010; AASM, 2001).

1.4.2. Subjektiivsed meetodid EDS-i hindamiseks

Päevast liigunisust on võimalik hinnata ka subjektiivselt ning selle peamised eelised on vähene ajakulu, paindlikumad meetmed (ei ole tarvis spetsiaalselt tehnikat) ning odavus (Johns, 1991). Peamiseks puuduseks subjektiivsete meetodite juures on väike usaldusväärsus (Sullivan ja Kushida, 2008).

Kasutusel on kaks peamist küsimustikku: Epworth Sleepiness Scale ning Stanford Sleepiness scale. Esimese töötas välja Murray Johns 1991. aastal Austraalias. Küsimustikuga palutakse hinnata iseenda magama jäämise harjumusi kaheksas erinevas situatsioonis skaalal 0-3. Miinimum skooriks on 0 ja maksimumiks 24. EDS esineb tavaliselt inimesel, kelle tulemus küsitluses on suurem kui 16. Stanfordini unisuse skaala korral tuleb katsealusel hinnata iseenda unisust/erksust teatud aja hetkel. Kliiniliste uuringute tarvis soovitatakse siiski enam kasutada Epworth Sleepiness Scale'i, kuna antud küsitlus korreleerub paremini objektiivsete meetoditega kui teised subjektiivsed testid (Johns, 1991; Akintomide ja Rickards, 2011).

Narkolepsia raskusaste varieerub erinevatel indiviididel olulisel määral, mistõttu kliinilises praktikas võib haigustunnuste valesti interpreteerimine viia vale diagnoosi määramiseni. Narkolepsia segiajamine teiste haigustega (mõni muu unehäire, näiteks uneapnoe, hüpersomniad, rahutute jalgade sündroom; epilepsia, ravimite kõrvalnähud) on üsna levinud. Haiguse kindlakstegemist raskendab ka väga mitmete teiste terviserikete (meeleolu kõikumised, depressioon, ärevushäired, migreen jne) esinemine paralleelselt narkolepsiga (Morrish jt., 2004; Black jt., 2013).

1.4.3. HLA genotüpiseerimine

Teadaolevalt on narkolepsia haigus, mis on kõige enam mõjutatud HLA alleelide poolt (Han jt., 2012a). Seega on lisaks testidele võimalik läbi viia narkoleptikute HLA genotüpiseerimist. Erandid välja jättes, on peaaegu kõik narkolepsia-katapleksia patsiendid HLA *DQB1*0602* positiivsed, kuid vaid umbes 40% narkoleptikutest, kel ei esine katapleksiat kannavad antud narkolepsias eoselist markerit. *DQB1*0602* negatiivseid narkolepsia-katapleksia haigeid esineb harva ning neidki on kirjeldatud eelkõige perekondliku tausta alusel. Teiste etniliste gruppide narkolepsiahaigetel, näiteks jaapanlastel, on näidatud 100% tõenäosusega seost *DQB1*0602* positiivsusega. Üldpopulatsioonis kannab antud markerit 12-38% indiviididest, kusjuures Iisraeli juutidel on kandjasagedus veidi väiksem. Seega, *DQB1*0602* positiivsus ei põhjusta alati narkolepsiasse haigestumist, kuid näitab suurenenud eelsoodumust antud terviserikke esinemiseks (AASM, 2001; Hor jt., 2010; Mignot, 1998; Tafti, 2009).

1.5. Narkolepsia tekkepõhjused

On olemas mitmeid hüpoteese selle kohta, mis narkolepsiat esile kutsub. Teadustööd näitavad, et narkoleptikute järglased võivad narkolepsia-katapleksiasse haigestuda 10-40 korda suurema tõenäosusega, kui üldpopulatsiooni rahvas. Siiski hoolimata geneetilise eelsoodumuse rollist narkolepsia arengus, tõestavad monosügootsete kaksikutega läbiviidud uuringud, et ka keskkonnafaktorid avaldavad mõju narkolepsia tekkimisele, kuna umbes 30% uuritud monosügootsetest kaksikute paaridest olid narkolepsia suhtes konkordantsed (Mignot, 1998).

Seos spetsiifilise HLA alatüübiga on viinud arusaamale, et narkolepsial võib olla autoimmuunseoseline taust (Luca jt., 2013). Häire avaldumist iseloomustab ka hüpokretiini tootvate neuronite defitsiit ajus (Lin jt., 1999; Chemelli jt., 1999). Lisaks on uuritud bakteri *Streptococcus pyogenes*’e poolt põhjustatud infektsioonide (Aran jt., 2009) ning 2009. aastal puhkenud märkimisväärse H1N1 seagripi pandeemia tagajärjel tekkinud narkolepsiajuhte

(Partinen jt., 2012; Han jt., 2011). Seoseid narkolepsiaga on leitud kokkupuutel raskemetallide, väetiste, putuka- ning umbrohutõrjevahenditega (Ton jt., 2010).

1.5.1. Hüpokretiini defitsiit seljaaju vedelikus

Suur edasimineku narkolepsia uuringutes saavutati siis, kui avastati seos hüpokretiini ehk oreksiini ja narkolepsia vahel (Sakurai jt., 1998). Esimest korda näidati inimestel hüpokretiini defitsiidi seotust narkolepsia-kataplexiaga aastal 2000 – üheksast patsiendist seitsme puhul ei olnud võimalik oreksiini CSF-st tuvastada, kuid kõigil uuringus osalenud kontrollindiviididel (8) oli neuropeptiidi tase mõõdetav (Nishino jt., 2000b). Umbes 90% narkolepsia-kataplexia haigetest ning 10-20% narkoleptikutel ilma kataplexiata on hüpokretiini tase CSF-s väga madal (Thannickal, 2000).

Hüpokretiin reguleerib toitumisega seotud funktsioone, une- ja ärkveloleku perioode ning neuroendokriinset homöostaasi (Bonnavion ja de Lecea, 2010). Hüpokretiini sünteesib aju hüpotalamuse lateraalne osa ja seda toodetakse valkude eellastest, mida nimetatakse prepro-hüpokretiinideks. Viimased lõhustatakse ensümaatilisel kaheks peptiidiks – hüpokretiin 1 ja 2 (nimetatakse ka oreksiin A ja B), mis koosnevad vastavalt 33 ja 28 aminohappest (Sakurai jt., 1998).

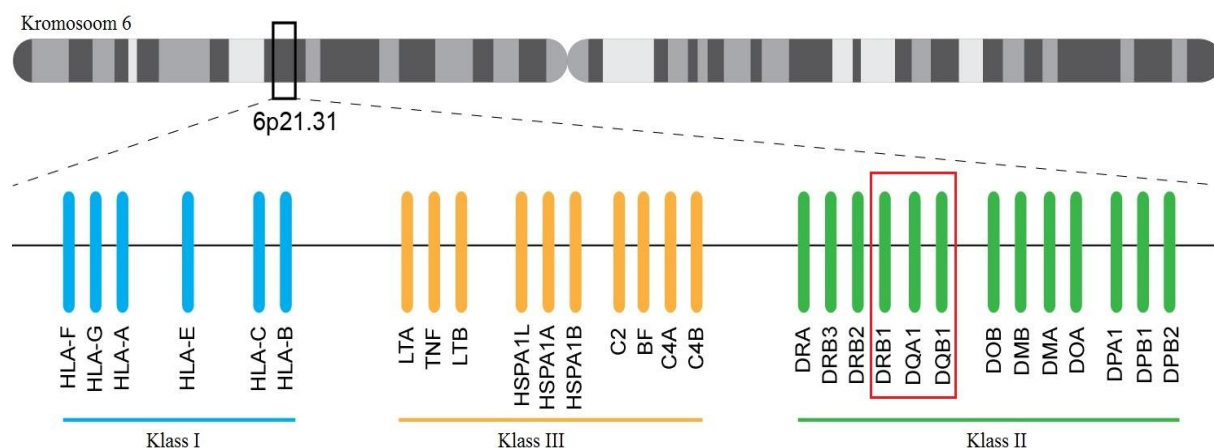
1999. aastaks jõuti selgusele, et koertel esineva autosomaal-retsessiivse narkolepsia vormi tekkimise eest vastutab mutatsioon hüpokretiini retseptor 2 kodeerivas geenis *HCRT2* (Lin jt., 1999). Narkolepsia-sarnast fenotüüpi on täheldatud ka prepro-hüpokretiini *knockout* hiire mudelil (Chemelli jt., 1999).

Narkolepsia avaldumine inimestel, erinevalt koertest, on seotud umbes 70 000 hüpokretiini tootva neuroni hävimisega ajus, kuid mitte mutatsioonidega hüpokretiini retseptoreid kodeerivas geenis (Thannickal jt., 2000). Seejuures näib konkreetsete rakkude kadu olevat selektiivne, kuna MCH (melaniini kontsentreeriv hormoon) neuronid, mis on põimunud oreksiini produtseerivate rakkudega, näivad olevat täiesti puutumata (Thannickal jt., 2009).

1.5.2. HLA DQB1*0602

Esimesed tööd, milles näidati spetsiifilise HLA haplotüübi seotust narkolepsiaga, ilmusid juba 1984. aastal (Juji jt., 1984). Hiljuti teostatud narkolepsia ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (GWAS) on samuti näidanud kõige tähendusrikkamat seost 6. kromosoomis paikneva HLA klass II regiooni spetsiifilise markeriga *DQB1*0602* (Joonis 1; Miyagawa jt., 2008). Viimases kodeeritakse mitmeid MHC klass II subtüüpide valke, mis

esitlevad võõrpeptiide T-rakkudele infektsiooni ajal, aktiveerides sellega immuunvastust T-raku antigeensete retseptorite (TCR) kaudu (Faraco jt., 2013).



Joonis 1. **HLA regioon inimese 6. kromosoomis**³, kohandatud

Nii Euroopas kui ka Ida-Aasias mängib kõige olulisemat rolli narkolepsia esinemises HLA-*DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602* haplotüüp. Tafti ja kolleegide poolt eurooplaste seas läbi viidud uuringus avastati, et tervetel inimestel (1889) esinevad märkimisväärselt sagedamini *DQB1*0304*, *0402*, *0502* ja *0604* markerid ning ainuke marker, mida esines sagedamini katapleksiast omavatel narkoleptikutel (1029) oli *DQB1*0602*. Viimase kandjatel on 251 korda kõrgem tõenäosus haigestuda narkolepsiasse kui *DQB1*0602* negatiivsetel indiviididel. Veel on selgeks tehtud, et *DQB1*0602* homosügootsus võrreldes heterosügootsusega suurendab narkolepsia riski kaks korda (Han jt., 2012a; Tafti jt., 2014).

1.5.3. HLA regiooni väliste narkolepsiaga seost näitavate polümorfismide leidmine GWAS uuringutega

Nii nagu paljude teiste haiguste korral, on ka narkolepsia kandidaatgeenide väljaselgitamiseks kasutatud GWAS-e, eesmärgiga leida teisi genoomi piirkondi, mis lisaks HLA spetsiifilistele alleelidele võiksid olla seotud narkolepsia väljakujunemisega (Hor, 2013). Lisas 1 on välja toodud kõik ühenukleotiidsed polümorfismid (SNP), mis on osutunud oluliseks erinevate populatsioonide uurimisel.

Kõige esimene narkolepsiaga seotud GWAS viidi läbi Jaapanis, kus ei leitud ühtegi ülegenoomselt tähendusrikast assotsiatsiooni; tugevaim seos narkolepsiaga leiti markeriga rs5770917 T>C (Miyagawa jt., 2008). Nimetatud marker paikneb *CPT1B/CHKB* geenide vahel. Selle sama markeri replikatsiooniuuringus korealastel leiti samuti seos narkolepsiaga. Seejuures näidati, et rs5770917 heterosügootide *CPT1B* ning *CHKB* geenide mRNA

³<http://www.sciscogenetics.com/technology/human-leukocyte-antigen-complex/>

ekspressiooni tase leukotsüütides on langenud võrreldes TT homosügootidega (Miyagawa jt., 2008). Leitud seost ei ole korratud hiinlaste ega eurooplaste seas läbiviidud uuringutes, ilmselt konkreetse riskialleeli madalama esinemissageduse tõttu neis populatsioonis (Han jt., 2012b; Hallmayer jt., 2009).

Jaapanlaste populatsioonis on läbi viidud veel teinegi uuring, milles uuriti 202 kandidaatgeeni. Parimad tulemused saadi markeritega geenidest *NFATC2*, *SCP2*, *CACNA1C*, *TCRA/DAD1*, *POLE*, *FAM3D*, kuid leitud seosed ei olnud eriti tähendusrikkad (Shimada jt., 2010). Samas *TCRA/DAD1* lookuses leiti eurooplaste seas läbi viidud uuringus seos rs1154155 ja narkolepsia vahel; uuringus võrreldi HLA *DQBI*0602* positiivseid patsiente HLA *DQBI*0602* positiivsete kontrollidega (Hallmayer jt., 2009).

1.5.3.1. Narkolepsiaseoseline marker *TCRA* lookuses

TCRA (T-raku antigeense retseptori alfa lookus) geeni marker rs1154155 on ainus HLA-st sõltumatu narkolepsiaseoseline marker, mis on replitseerunud kõigis läbiviidud uuringutes (Hor, 2013). T-raku antigeensed retseptorid on heterodimeersed valgud, mida ekspresseeritakse T-rakkude pinnal. Antud retseptorite ülesanne on ära tunda MHC valkude poolt esitletud võõr- või kehaomaseid antigeene, millele järgneb immuunvastuse initsieerimine ja reguleerimine (Vyse, 2009; Faraco jt., 2013).

TCR valk koosneb α - ja β -ahelatest. Selleks, et saada uusi ning unikaalseid antigeen-spetsiifilisi TCR vorme, on tarvis erinevate DNA somaatiliste rekombinatsioonide läbiviimine V, D ja J segmentidega T-rakkude arenemise ajal. J segmentide seos narkolepsiaga on tugevaim, kuna marker rs1154155 paikneb J10 segmendi läheduses (Faraco jt., 2013). Leitud SNP (transversioon T>G) võib olla narkolepsiaga immunoloogiliselt seotud, suurendades antud haiguse avaldumise riski. Seda on näidatud erinevates populatsioonides, näiteks genotüüp GT suurendab haigestumise riski võrreldes genotüübiga TT 1,94 (95% CI 1,68-2,25) korda ning GG genotüüp 2,55 (95% CI 1,92-3,38) korda (Hallmayer jt., 2009). Seos *TCRA* lookuse ja narkolepsia vahel on unikaalne, kuna ühegi teise autoimmuunhaiguse puhul antud seost ei ole näidatud (Faraco jt., 2013).

1.5.3.2. Narkolepsiaseoseline marker *P2RY11* lookuses

Kirjeldatud on ka statistiliselt tähendusrikast seost narkolepsia ja 19. kromosoomis paikneva purinergilise retseptorgeeni *P2RY11* mittetransleeritud ala 3' UTR regioonis paikneva markeri rs2305795 vahel (Kornum jt., 2011). Purinergilised signaalid mängivad olulist rolli immuunregulatsioonis, moduleerides lümfotsüütide ja monotsüütide küpsemist, kemotaksist

ja apoptoosi (Bours jt., 2006). Läbiviidud uuringutest on leitud, et T-lümfotsüütides ja NK rakkudes (looduslikes tapja-T-rakkudes), kuid mitte teistes veres leiduvates mononukleaarsetes rakkudes *P2RY11* geeni mRNA ekspressiooni vähenemine on korrelatsioonis rs2305795 G>A variandi kandlusega (Kornum jt., 2011). Riskialleeli A poolt esile kutsutud *P2RY11* geeni mRNA ekspressiooni langus võib alandada vastupanu ATP-vahendatud raku surmale, potentsiaalselt muutes infektsioonide immuunvastust või mõjutades otseselt hüpokretiini sekreteerivaid neuroneid (Mahlios jt., 2013).

Eksoomi sekveneerimise uuringus kirjeldati lookuse *P2RY11* läheduses (20-100 kb) *DNMT1* geeni, mille 21. eksonis ilmnevad mutatsioonid on seostatavad narkolepsia fenotüübiga, kaasates täiendavaid kliinilisi sümptomeid nagu kurtus ning tserebellaarne ataksia. Kompleksfenotüüpi uuriti viiel patsiendil ning pakuti välja, et *DNMT1* geeni reguloorsed elemendid võivad asuda *P2RY11* lookuses. Veelgi enam, *P2RY11* marker rs2305795 vähendab ka *DNMT1* ekspressiooni leukotsüütides (Winkelmann jt., 2012; Kornum jt., 2011). *DNMT1* kui DNA metüültransferaasi ekspressioon on seotud immuunsüsteemiga, mängides olulist rolli reguloorsete T-rakkude diferentseerumises (Josefowicz jt., 2009).

1.5.3.3. ImmunoChip uuringud

Kuna järjest enam käsitletakse narkolepsiat kui immuunsüsteemi mõjutavat haigust, siis kasutati ühes uuringus Illumina ImmunoChip'i, millele on spetsiaalselt valitud ca 200 000 markerit immuun- ning põletikuliste haigustega seostatud genoomipiirkondadest, kaasa arvatud MHC regioonist. Selles uuringus näitasid genoomselt tähendusrikast seost narkolepsiaga lisaks *TCRA* markerile rs1154155 ka katepsiin H (*CTSH*) marker rs34593439 ning *TNF* superperekonna neljanda liikme (*TNFSF4* ehk *OX40L*) marker rs7553711 (Faraco jt., 2013).

Seosed *CTSH* ja *TNFSF4* geenide markerite ning narkolepsia vahel näitavad, et antud neuroloogilist unehäiret võivad esile kutsuda ka T-rakkude ja antigeene esitlevate rakkude defektsed interaktsioonid, kuna mõlema geeni produktid osalevad MHC II/antigeen kompleksi moodustumises (Faraco jt., 2013). Katepsiinid on endosomaalsed/lüsoosomaalsed madala pH poolt aktiveeritavad ensüümid, osaledes lisaks peptiid/MHC II interaktsioonidele ka valkude ümbertöötlemises ning antigeenide protsessimises (Conus ja Simon, 2010). Marker rs34593439 paikneb *CTSH* geeni esimeses intronis. Ühe hüpoteesi kohaselt võib narkolepsia olla tingitud vähenenud *CTSH* aktiivsusest, mis pärssib antigeenide töötlemist, muutes seeläbi *DQB1*0602* poolt esitletud peptiidide repertuaari (Faraco jt., 2013).

T-rakkude aktiveerimiseks ehk T-raku antigeensete retseptorite ning MHC II/antigeen kompleksi moodustumiseks on tarvis kostimulaatormolekule, milleks on *TNSRSF4* (alias *OX40*) ning *TNFSF4* (alias *OX40L*) retseptor-ligand paarid. Nende kahe interaktsioonidel tekkivad kostimuleerivad signaalid tõstavad efektor T-rakkude ellujäämist ja uue põlvkonna T-mälurakkude arengut. Narkolepsiaseoseline marker rs7553711 paikneb *OX40L* geenis, mõjutades antigeenide esitlemist T-rakkudele (Faraco jt., 2013).

1.5.3.4. HLA marker rs2858884 ja protektiivsed HLA alleelid

GWAS-i tulemusena on avastatud HLA-*DQA2* regioonis marker rs2858884, mille tähendusrikast assotsiatsiooni narkolepsiaga on suudetud tõestada nii *discovery*- kui ka kombineeritud uuringurühmas. Minoorse alleeli C esinemissagedus kontrollgrupis, kel esines HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* haplotüüp, oli suurem (17%) kui narkoleptikutel (10%), viidates harvem esineva alleeli tugevale kaitsvale efektile (Hor jt., 2010). 2014. aastal esitletud töös replitseeriti seost sama markeriga. Lisaks sellele leiti HLA *DQB1*0602* positiivseid patsiente ja vastavaid positiivseid kontrolle uurides protektiivsed alleelid eurooplaste hulgas: *DQB1*0603*, *DQB1*0501*, *DQB1*0609* ja *DQB1*02*, mis kaitsevad narkolepsia eest (Tafti jt., 2014; Han jt., 2012a).

1.6. Narkolepsia kui autoimmuunhaigus

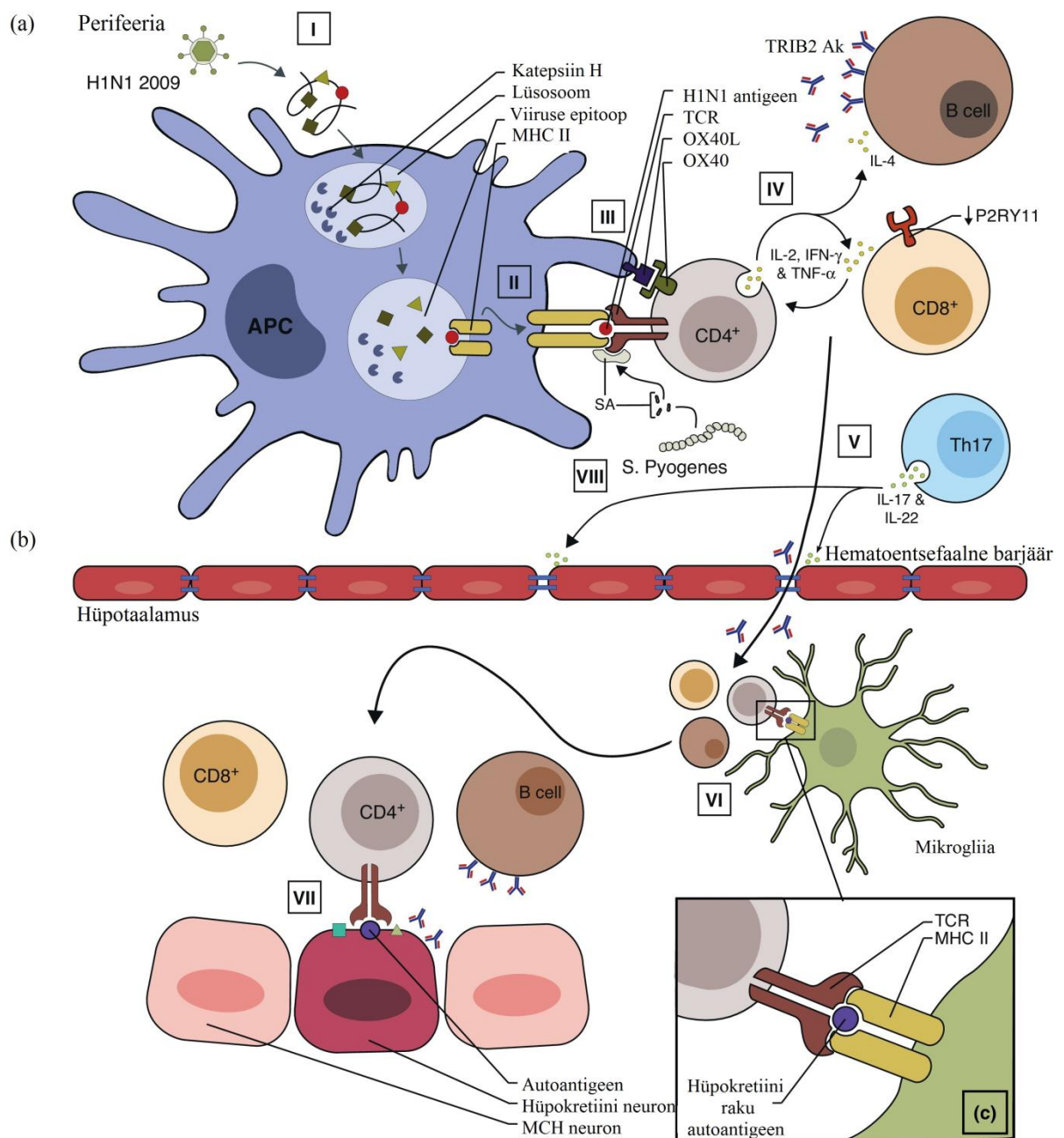
TCRA, *P2RY11*, *DNMT1*, *CTSH* ja *TNFSF4* lookused, kus paiknevad GWAS-ide tulemusena leitud narkolepsiaseoselised markerid, on olulised immuunvastuses (Hallmayer jt., 2009; Kornum jt., 2011; Mahlios jt., 2013). Antud seosed ning HLA *DQB1*0602* markeri esinemine viitavad narkolepsiale kui autoimmuunhaigusele, kuna väga paljusid autoimmuunhaiguseid (näiteks I tüüpi diabeet ning reumatoidartriit) iseloomustab kindlate HLA haplotüüpide esinemine (Chabas jt., 2003).

2009. aasta teises pooles puhkes pandeemiline gripiviirus H1N1, rahvapärasema nimetusega seagripiviirus. Euroopa Liidus kiideti antud viiruse kontrolli all hoidmiseks heaks kolm vaktsiini: Pandremix, Focteria ja Celvapan (Fugger ja Steinman, 2014). Umbes aasta pärast vaktsineerimist ilmunud aruannetes väideti, et nii Soomes kui ka Rootsis suurenes alla 20 aasta vanuste noorte hulgas narkolepsiasse haigestumise risk vastavalt 12,7 ja 3 korda. Kahtlustatakse, et vaktsiin Pandremix, mille adjuvandiks oli AS03, on põhjustanud narkolepsiasse haigestumise sageduse tõusu HLA *DQB1*0602* positiivsetel lastel (Nohynek jt., 2012; Persson jt., 2014).

Ka Hiinas teavitati kolmekordsest narkolepsia esinemissageduse tõusust pärast gripiviiruse A epideemiat. Antud juhul ei olnud tegu vaktsineerimise tagajärjel toimunud haigestumisega, kuna uuringus osalenutest olid vaktsineeritud vaid 5,6% (Han jt., 2011). Pärast pandeemia raugemist vähenes narkolepsiasse haigestumise sagedus (Han jt., 2013).

Konkreetselt seost narkolepsia ning vaktsineerimise vahel ei ole veel selgeks tehtud, kuid ilmselt on gripiviiruse ja narkolepsia vaheliseks lüliks autoimmuunsusega seotud aspektid (De la Herrán-Arita ja García-García, 2014). Autoimmuunsuse korral nähakse keha enda peptiide võõrana ning sellele järgneb spetsiifilise koe hävitamine, mis on seotud HLA alleelide (näiteks *DQB1*0602*) poolt põhjustatud geneetilise riski tõusuga haigestunutel (Mahlios jt., 2013). Ühe püstitatud hüpoteesi kohaselt kutsub narkolepsiat esile autoimmuunne hüpokretiini tootvate neuronite hävimine (Joonis 2), millega kaasneb hüpokretiini taseme languse CSF-s (De la Herrán-Arita ja García-García, 2014).

Gripiviiruse ning vaktsineerimise tagajärjel esile tulnud autoimmuunset hüpokretiini neuronite hävimist on kirjeldatud mitmel viisil. Arvestades, et nii vaktsiin Pandremix kui ka lihtsalt nakkus gripiviirusega võivad vallandada narkolepsiat, siis ilmselt esinevad nii viirustes kui ka vaktsiinides epitoobid (millised, see on praeguseks veel teadmata), mis sarnanevad oma ehituselt peremehes esinevatele epitoopidele ehk antud juhul hüpokretiini rakkudele (Lisa 2; Fugger ja Steinman, 2014). Sellist fenomeni nimetatakse molekulaarseks mimikriks, mille puhul immuunsüsteemil on raske eristada kehaomaseid struktuure võõrstruktuuridest (Mahlios jt., 2013).



Current Opinion in Neurobiology

Joonis 2. **Autoimmuunsus ja hüpokretiini rakkude hävimine.** (I) Fagotsütoosile järgneb antigeene esitlevate rakkude (APC) poolt indutseeritud H1N1 gripiviiruse partiklite lagundamine lüsoosoomides, protsessi vahendab katepsiin H. (II) Viirusest pärit peptiide esitletakse APC-de pinnal MHC II (*DQA1*01:02-DQB1*0602*) komplekside abil CD4⁺ T-rakkudele. (III) Hüpokretiini spetsiifilised CD4⁺ T-rakud aktiveeruvad pärast esitletud antigeeni äratundmist. Pärast aktiveerimist intensiivistub CD4⁺ T-rakkudes *OX40* ekspressioon, mis on tähtis kostimuleeriv molekul. *OX40* tunneb ära APC-d, milles on ekspresseritud *OX40L* ligand. (IV) Aktiveeritud CD4⁺ T-rakud sekreteerivad IFN-γ, TNF-α ja IL-2, mis stimuleerivad CD8⁺ T-rakke ja juhivad Th1 (T-abiastaja rakud) vahendatud immuunvastuseni. Aktiveeritud CD4⁺ T-rakkudest pärit IL-4 soodustab humoraalset vastust, viies *TRIB2* antikehade tootmiseni B-rakkudes. (V) Streptokoki infektsiooni tulemusel genereeritud antigeenid aktiveerivad Th17 rakke, mille poolt produtseeritud IL-17 ning IL-22 osalevad hematoentsefaalbarjääri (BBB) muutmisel läbitavaks. Suurenenud läbilaskvus võimaldab T- ja B-rakkude ning Tribbles2 antikehade migratsiooni kesknärvisüsteemi. (VI) Aktiveeritud T- ja B-rakkude läbivad BBB ja interakteeruvad CNS-s APC-dega (mikroglia),

mis esitlevad hüpokretiinirakkude autoantigeene *DQA1*01:02-DQB1*0602* kontekstis. (VII) Reaktiveeritud T-rakud jõuavad hüpotaalamusse, tunnevad ära hüpokretiini tootvad neuronid, indutseerivad tsütokiinide ja tsütotoksiliste ühendite sekretsiooni. Veelgi enam, streptokoki superantigeenid võivad ühendada MHC ja TCR molekulid antigeeni spetsiifilisusest sõltumata, tuues kaasa autoreaktiivsete T-rakkude aktivatsiooni. See võib viia hüpokretiini-spetsiifiliste antigeenide sensibiliseerimiseni ja CD4⁺ T-rakkude võimendunud ristreaktsioonideni, mis viib autoimmuunse reaktsioonini hüpokretiini neuronite vastu (Mahlios jt., 2013, kohandatud).

Narkolepsiat seovad immuunsüsteemiga ka antikehad, mida toodetakse valgu Tribbles homoloog 2 (TRIB2) vastu. TRIB2 valke produtseeritakse hüpokretiini rakkudes (Lim ja Scammell, 2010). TRIB2 on identifitseeritud kui esimene haigus-spetsiifiline autoantigeen 16-26% narkoleptikutel (Cvetkovic-Lopes jt., 2010; Kawashima jt., 2010; Toyoda jt., 2010). On avastatud, et mida vähem on narkolepsia-katapleksia avaldumisest möödas, seda suurema tõenäosusega sisaldab narkoleptikute organism anti-TRIB2 autoantikehasid, kusjuures antud autoantikehi esineb rohkem *DQB1*0602* positiivsetel narkolepsia-katapleksia haigetel kui üksnes narkolepsiat põdevatel inimestel (Kawashima jt., 2010).

Kliiniliselt on veel väljaselgitamata, kas TRIB2 autoantikehad ise ründavad hüpokretiini produtseerivaid rakke või on vastavate antikehade toodang tagajärg hüpokretiini-rakkude hävimisele või hoopis on tegu lihtsalt kokkusattumusega ning seos närvirakkude hävimisega puudub (Fontana jt., 2010; Lim ja Scammell, 2010).

Veel on avastatud, et inividid, kel on esinenud bakteri *Streptococcus* poolt põhjustatud kurgupõletik enne 21. eluaastat, võivad viis korda suurema tõenäosusega haigestuda narkolepsiasse (Koepsell jt., 2010). Vastuvõtlikkus neuroloogilisele unehäirele on seotud ülemiste hingemisteede infektsioonidega, kaasaarvatud nendega, mida põhjustab bakter *Streptococcus pyogenes*. Mõõtmistulemustena on kindlaks tehtud antud bakteri poolt produtseeritava toksiini (streptolüsiin O) vastaste antikehade (ASO) hulk, mis on narkoleptikute organismis kõrgem kui samavanustel kontrollgrupi inivididel. Seejuures on antikehade kontsentratsioon on seda suurem, mida vähem on narkolepsia algusajast möödas ehk siis aja möödudes antikehade hulk organismis väheneb (Aran jt., 2009).

1.7. Ravi

Narkolepsia, kui igapäevaelu mõjutav neuroloogiline häire, ei avalda mõju üksnes haigele endale, vaid ka tema lähedastele. Lisaks väiksemale sissetulekule ning suurtele väljaminekutele seoses ravikuludega, võib antud haigusega kaasneda tõsiseid sotsiaalseid tagajärgi, nagu näiteks töökaotus, ebakõlad suhetes, haridusevõimaluste vähenemine ja palju muud (Jennum jt., 2012).

Narkolepsiat, mis põhjustab kõike eelpool mainitut, otseselt ravida ei ole võimalik. Üksnes sümptomite mitte-farmakoloogiline või farmakoloogiline leevendamine aitab tõhustada narkoleptikute elu kvaliteeti. Viimane tuleks kasutusele võtta alles siis, kui alternatiivsed võimalused: unehügieeni parandamine ning planeeritud unemustrite järgimine enam ei aita (Sonka ja Susta, 2012). Üldiselt peetakse mittefarmakoloogilist ravi siiski sekundaarseks, kuna planeeritud uinakute mõju ei ole piisav, et vältida ootamatuid unesööstusid (Morgenthaler jt., 2007).

Päevase liigunisuse kontrolli alla hoidmiseks on olemas mitmeid tüüpe ravimeid: tavapärased kesknärvisüsteemi (CNS) stimulandid (amfetamiin ja selle derivaadid), mitte-amfetamiinsed CNS stimulandid (modafinil, armodafinil), naatriumoksübaat, kofeiin, stimulandi omadustega antidepressandid ja muud uued arstimid (Sonka ja Susta, 2012). Spetsiifilist sümptomit, katapleksiat, on võimalik piirata tritsükliliste antidepressantidega, nagu näiteks protriptüliin, klomipramiin või venlafaksiin. Sealjuures tuleb erinevate preparaatide manustamisel arvestada ka kõrvalmõjudega: allergia, iiveldus, söögiisu kaotamine või psühholoogilised probleemid (Mignot, 2012).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud töö praktilise osa eesmärkideks oli:

- genotüpiseerida Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu andmebaasis olevate narkolepsia diagnoosiga geenidoonoritel järgnevad narkolepsiaseoselised polümorfismid (rs1154155 *TCRA* lookuses ja rs2305795 *P2RY11* lookuses) riskialleelide identifitseerimiseks
- hinnata antud indiviididel narkolepsiaseoselise HLA variandi *DQB1*0602* esinemist
- hinnata *TCRA* lookuse polümorfismi rs1154155, HLA regiooni polümorfismi rs2858884 ning HLA *DRB1*1501/DQB1*0602* haplotüüpi kirjeldava tag SNP-i (rs3135388) harvem esineva alleeli sagedust tervetel geenidoonoritel

Käesolevas töös läbiviidavate uuringute teostamiseks on geenidoonorid andnud informeeritud nõusoleku ning on olemas Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee luba.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Valim

Käesoleval ajal kuulub TÜ Eesti Geenivaramu geenidoonorite hulka 17 narkolepsia diagnoosiga inimest, kellest 10 on mehed ning 7 naised. Narkolepsia diagnoos on kinnitatud unekliinikus. Valimisse kuuluvate geenidoonorite keskmine vanus on 40 eluaastat ($SD \pm 14,8$ aastat), noorim 19 aastane ning vanim 66 aastane.

Tervete geenidoonorite valimi moodustasid 4400 indiviidi, kes olid eelnevalt TÜ Eesti Geenivaramus genotüpiseeritud Illumina Infinium HumanExome BeadChip kiibiga, mis sisaldab >240 000 eksoomipiirkondades paikneva markeri, mida kasutatakse leidmaks funktsionaalseid markereid oluliste seoste leidmiseks erinevate inimese tervise- ja haigusseisundite puhul.

2.2.2. Uuritavate geenide amplifitseerimine ning genotüpiseerimine

Geenis *TCRA* esineva piirkonna, kus paikneb SNP rs1154155 ning geenis *P2RY11* esineva piirkonna, kus paikneb SNP rs2305795, amplifitseerimised teostati PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) meetodil. Eelnevalt maskeeritud (eemaldati praimerite seondumiseks sobilike kandidaatjärjestuste probleemsed kohad: kordusregioonid ja SNP-d programmiga SNPmasker

1.1)⁴ lähtejärjestuse abil disainiti konkreetseid praimerid Primer3web versioon 4.0.0 abil⁵ järgnevate kriteeriumide alusel: praimerite pikkus 18-23 bp, sulamistemperatuur 57-62°C, GC sisaldus 30-70%, produkti pikkus kuni 600 bp. Unikaalsust ehk ainult ühe konkreetse produkti saamist kontrolliti veebipõhise programmiga⁶ GenomeTester 1.3. Saadi järgnevad praimerite paarid:

- *TCRA* geen (rs1154155)

forward 5'-GGCATCAAACACTGTGATACTCA-3'

reverse 5'-GGGGCACAATCTCTGGAATG-3'

- *P2RY11* geen (rs2305795)

forward 5'-AAGACCCCAGACACCCAAG-3'

reverse 5'-GGTCACTTGTCCTAGGGTCG-3'

HLA *DQB1**0602 genotüüpiseerimiseks vajalikud PCR-i praimerid saadi Hallmayer jt., 2009. aasta tööst:

forward 5'- CCCGCAGAGGATTTTCGTGTT-3'

reverse 5'- AACTCCGCCCCGGGTCCC-3'

Ühe PCR reaktsiooni jaoks vajaliku segu kogumaht oli 25 µl, mis sisaldas järgmisi komponente:

10× reaktsioonipuhver B	2,5 µl
(0,8 M Tris-HCl, 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2% w/v Tween 20, Solis BioDyne, Eesti)	
MgCl ₂ (25 mM, Solis BioDyne, Eesti)	2,5 µl
dNTP-de segu (2,5 mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Thermo Scientific, USA)	2,5 µl
Forward praimer (10 pmol/µl, Metabion International AG, Saksamaa)	2 µl
Reverse praimer (10 pmol/µl, Metabion International AG, Saksamaa)	2 µl
HOT FirePol® DNA polümeraas (5 U/µl, Solis BioDyne, Eesti)	0,3 µl
Uuritav DNA (~20 ng/µl)	1 µl
Lõppmahuni deioniseeritud vett	12,2 µl

Geenis *TCRA* esineva piirkonna amplifitseerimise jaoks vajalik PCR viidi läbi termotsükleris (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, USA) järgneval režiimil:

⁴<http://bioinfo.ebc.ee/snpmasker/>

⁵<http://primer3.ut.ee/>

⁶<http://bioinfo.ut.ee/genometester/>

algne denaturatsioon	95°C	15 minutit
denaturatsioon	95°C	30 sek
praimerite seondumine	62°C	30 sek
DNA süntees	72°C	40 sek
Kokku 5 tsüklit <i>touchdown</i> meetodil (iga tsükkel - 2°C)		
denaturatsioon	95°C	30 sek
praimerite seondumine	52°C	30 sek
DNA süntees	72°C	40 sek
Kokku 30 tsüklit		
Lõpp elongatsioon	72°C	10 min

Geenis *P2RY11* esineva piirkonna amplifitseerimise jaoks vajalik PCR viidi läbi termotsükleris (Arktik™ Thermal Cycler, Thermo Scientific, USA), järgneval režiimil:

algne denaturatsioon	95°C	15 minutit
denaturatsioon	95°C	30 sek
praimerite seondumine	62°C	30 sek
DNA süntees	72°C	40 sek
Kokku 3 tsüklit <i>touchdown</i> meetodil (iga tsükkel - 2°C)		
denaturatsioon	95°C	30 sek
praimerite seondumine	56°C	30 sek
DNA süntees	72°C	40 sek
Kokku 30 tsüklit		
Lõpp elongatsioon	72°C	10 min

HLA piirkonna DNA amplifitseerimise jaoks vajalik PCR viidi läbi termotsükleris (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, USA) järgneval režiimil:

algne denaturatsioon	95°C	15 minutit
denaturatsioon	95°C	30 sek
praimerite seondumine	63°C	30 sek
DNA süntees	72°C	1 min
Kokku 35 tsüklit		
Lõpp elongatsioon	72°C	10 min

Saadud 531 bp pikkused *TCRA* geeni produktid, 472 bp pikkused *P2RY11* geeni produktid ning spetsiifilise HLA regiooni 218 bp pikkused fragmendid lahutati 1% agarosgeelis

geelelektroforeesil, mille valmistamiseks kasutati 0,5× TBE puhvrit (0,045 M Tris-boraat; 0,001 M EDTA·Na₂), kuhu lisati 3 µl etiidiumbromiidi (5 mg/ml). 5 µl proovi ja 2 µl laadimispuhvrit (Thermo Scientific 6× Orange DNA Loading Dye, USA) segati ning kanti geeli hambasse. Pikkusmarkeriks geelil oli Thermo Scientific O'GeneRuler 50 bp DNA ladder (USA). Elektroforees toimus pingel 170 volti. DNA visualiseerimiseks kasutati UV valgust.

2.2.3. PCR produktide sekveneerimine

PCR produktide primaarstruktuuri määramiseks kasutati Sangeri sekveneerimise meetodit. Esmase etapina puhastati PCR reaktsioonid kasutamata jäänud praimeritest ning desoksüribonukleotiididest. Selle jaoks lisati 5 µl PCR-i produktile 1 µl aluselist fosfataasi FastAP (1 U/µl, Thermo Scientific, USA) ning 0,5 µl ensüümi eksonukleas I (20 U/µl, Fermentas, Leedu). Järgnevalt inkubeeriti segatud ning tsentrifuugitud proove termotsükleris 37°C juures 20 minutit ning seejärel inaktiveeriti ensüümid 15 minuti jooksul 80°C juures.

Sekveneerimisreaktsioonid valmistati iga produkti kohta mõlema praimeriga eraldi. Selle jaoks segati kokku 1,3 µl puhastatud PCR produkti, 0,7 µl *premix*'i (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100, Applied Biosystems, USA), 2 µl lahjenduspuhvrit (BigDye[®] v1.1, 3.1 5× Sequencing Buffer, Applied Biosystems, USA), 0,9 µl forward-/reverse praimerit ning 5,1 µl deioniseeritud vett. Sekveneerimisprogramm viidi läbi PCR termotsükleris (GeneAmp[®] PCR System 2700, Applied Biosystems, USA) režiimiga:

denaturatsioon	95°C	20 sek
praimerite seondumine	50°C	15 sek
ahelate süntees	60°C	1 min

Kokku 30 tsüklit

DNA sadestamiseks lisati igale termotsüklerist võetud proovile 2 µl naatriumatsetaat+dekstraan segu ning 30 µl külma 95% etanooli. Segud tuubides segati ning asetati 30 minutiks -20°C juurde. Järgnevalt tsentrifuugiti sade põhja 20 minuti jooksul +4°C juures 13 000 pööret minutis. Pärast supernatandi eemaldamist lisati igasse tuubi 120 µl külma 70% etanooli, millele järgnes proovide uus tsentrifuugimine 5 minuti jooksul +4°C juures 13 000 pööret minutis. Supernatandi eemaldamisele järgnes sademe kuivatamine avatud kaanega tuubides +37°C juures. Sade lahustati 70% formamiidis, mida lisati 12 µl. 10

ül proovi kasutati sekveneerimiseks. Sekveneerimine teostati Eesti Biokeskuse tuumiklaboris. Saadud tulemusi analüüsiti programmiga BioEdit versioon 7.2.5.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Narkolepsia patsientide fenotüüp

TÜ Eesti Geenivaramu andmebaasis sisalduvate andmete põhjal oli narkolepsia patsientide keskmiseks vanuseks diagnoosi saamisel 37 eluaastat ($SD \pm 16$ aastat), see juures meestel 31 eluaastat ($SD \pm 11,5$ aastat) ning naistel 45 eluaastat ($SD \pm 18,5$ aastat). Kuuel inimesel tuvastati haigus 16-25 aasta vanuselt ning ülejäänud 11 inimesel vahemikus 28-67 eluaastat. Antud seitsmeteistkümnest indiviidist esineb katapleksia diagnoosi kirjelduses kindlalt üksnes kahel geenidoonoril, teistel ainuomast sümptomit ei ole tuvastatud või puuduvad selle kohta andmed. Luca ja kolleegide poolt avaldatud töös jääb keskmine diagnoosi saamise vanus $36,87 \pm 17,13$ eluaasta juurde, kusjuures meestel tuvastati antud haigus vanuses $36,80 \pm 17,40$ ning naistel $36,91 \pm 16,86$ eluaastat (Luca jt., 2013). Hoolimata väga väikesest valimist, on keskmine diagnoosi saamise vanus Eesti patsientidel üllatavalt sarnane vastavale näitajale mujal Euroopas.

Diagnoosimine sõltub paljudest teguritest, eelkõige sellest, millised ja kui tugevad on esmased sümptomid. Morrish jt. on leidnud, et esmased narkolepsia-katapleksiale viitavad sümptomid avalduvad inimestel tavaliselt vanuses 15-29 eluaastat (Morrish jt., 2004). Kahjuks on antud valimisse kuuluvate geenidoonorite esmaste sümptomite algusaeg teadmata ning seetõttu on järelduste tegemine keeruline. Küll aga võib näiteks varajast diagnoosimise aega seostada katapleksiaga – kui katapleksia on esimene sümptom või ilmneb suhteliselt ruttu peale EDS-i, on diagnoosi määramine lihtne, kuna ainuomast sümptomit on kerge narkolepsiaga seostada. Ometigi võib kataplektiliste atakkide avaldumine võtta aega ning kerged või harva esinevad katapleksiahood võivad jääda märkamatuks, mistõttu võib haiguse kindlaks tegemine olla keeruline ja jääda vanemasse ikka. Antud valimisse kuulnud kahel narkolepsia-katapleksia haigel oli katapleksia diagnostilise tunnusena varakult avaldunud ning võimaldas diagnoosi väljapanekut vastavalt 21 ja 22 aastaselt.

Uuringus osalenute andmeid analüüsides ilmneb, et lisaks narkolepsiale esineb patsientidel ka teisi kaasuvaid haigusi: une-ärkveloleku tsükli häired (1), obstruktiivne uneapnoe (4), rahutute jalgade sündroom (3), norskamine (2), uinumise ja une säilitamise häired ehk insomniad (1), ärevushäired (1) ning depressioon (4). Nimetatud kaasuvad haigusi on kirjeldatud ka varasemates töödes kui narkolepsiale iseloomulikke patoloogiasid, esinedes sagedamini

narkoleptikutel kui tavapopulatsioonis (AASM, 2001; Peacock ja Benca, 2010). Antud patsientidest üheteistkümnel esines vähemalt üks ning ühel 4 ülalnimetatut haigustest. Siiski mainitud häirete kaasesinemist ei saa otseselt narkolepsiaga seostada.

Keskmine BMI uuritavatel narkolepsia doonoritel on 27,2 (SD \pm 8,3), meestel 26,5 (SD \pm 5,4) ning naistel 28,1 (SD \pm 11,8). 8 inimese BMI on normaalses vahemikus (18,5-25), kuid üheksal on BMI >25, mis tähendab, et üle poolte antud valimi geenidoonoritest (53%) on ülekaalulised. Varasemas uuringus (Luca jt., 2013) leiti, et umbes 2/3 narkoleptikutest on ülekaalulised; keskmine BMI oli kokkulangev eestlastest patsientidega. Ülekaalu tekkimine ja rasvumine võivad narkolepsia puhul olla seotud hüpokretiini tootvate neuronite hävimisega. Kuna hüpokretiinid osalevad ka toitumise regulatsioonis, siis hüpokretiini taseme langus võib viia selliste muutusteni metabolismis, mis viivad kaalu tõusuni. Samas narkoleptikutel esinev depressioon võib samuti leida leevendust liigsöömises. Osadel juhtudel võib kehamassi suurenemine olla põhjustatud ka vähesest kehalisest aktiivsusest. Suurenenud BMI seost narkolepsiaga tuleks põhjalikumalt uurida, kuna ilmselt ei põhjustada seda ainult üks tegur.

2.3.2. Narkolepsiaseoseliste riskialleelide ning HLA *DQB10602 markeri esinemine narkolepsia diagnoosiga geenidoonoritel**

Narkolepsiaseoseliste riskialleelide sageduse hindamiseks määrasime narkolepsia patsientidel markerite rs1154155, rs2305795 ja HLA *DQB1**0602 genotüübid. Sekveneerimistulemuste analüüs näitas (Lisa 3), et *TCRA* marker rs1154155 T>G esineb üksnes neljal (1 GG homosügoot, 3 GT heterosügooti) indiviidil 17-st (23,5%) ning *P2RY11* marker rs2305795 G>A esineb 13 (8 AA homosügooti, 5 AG heterosügooti) indiviidil 17-st (76,5%). Kolm narkolepsiahaiget (17,6%) geenidoonorit on *DQB1**0602 alleeli kandjad (Tabel 1).

Tabel 1. Uuritud indiviidide genotüübid ning HLA markeri kandlus*

Indiviid	rs1154155 genotüüp	rs2305795 genotüüp	HLA <i>DQB1*0602</i>
1	GG	AA	-
2	GT	AA	-
3	GT	AG	-
4	GT	GG	-
5	TT	AA	+
6	TT	AA	+
7	TT	AA	+
8	TT	AA	-
9	TT	AA	-
10	TT	AA	-
11	TT	AG	-
12	TT	AG	-
13	TT	AG	-
14	TT	AG	-
15	TT	GG	-
16	TT	GG	-
17	TT	GG	-

*Rasvaselt on esitletud nimetatud markerite kirjanduses väljatoodud riskialleelid

TCRA markeri rs1154155 minoorse alleeli G sagedus (MAF) patsientidel on 0,147. Saadud tulemus langeb kokku HapMap-CEU referentspopulatsioonis (226 indiviidi) näidatud alleeli G sagedusega (0,146) tervete indiviidide hulgas. Eurooplastest narkolepsiahaigetel leiti G alleeli sageduseks 0,240 ning tervetel kontrollidel 0,140 (Hallmayer jt. 2009). Seega, antud töös uuritud patsientidel oli riskialleeli sagedus tunduvalt madalam. Samas, Hallmayeri jt. uuring hõlmas ainult narkolepsia ja katapleksia patsiente, kes olid lisaks ka kõik HLA *DQB1*0602* positiivsed.

P2RY11 markeri rs2305795 väidetava riskialleeli A sagedus patsientidel on 0,618. HapMap-CEU referentspopulatsioonis on näidatud alleeli A sageduseks 0,562; võrreldavat alleeli sagedust (0,608) näidati ka narkolepsiahaigete eurooplaste hulgas (Kornum jt., 2011).

HLA *DQB1*0602* kandjaid antud valimis on 17,6%. Kirjanduse väitel peaks *DQB1*0602* marker esinema >98% eurooplastest narkolepsia-katapleksia haigetel (Tafti jt., 2014) ning 40% narkoleptikutest, kel lihastoonusekadu ei esine (Tafti, 2009). Uuritud indiviidid, kel esineb ka katapleksia, ei ole *DQB1*0602* kandjad. Saadud tulemus ei vasta oodatule ja peamiseks põhjuseks on tõenäoliselt liiga väike valimi suurus. On võimalik ka, et mõnel uuritud geenidoonoritest on kergekujuline katapleksia veel tuvastamata ning nemad võivad olla HLA *DQB1*0602* kandjad.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et valimis ei ole ühtegi sellist indiviidi, kes oleksid kõigi kolme antud töös uuritud narkolepsiaseoselise markeri kandjad. Kolm patsienti, kellel esinesid riskialleelid nii *TCRA* kui *P2RY11* lookustes, ei olnud HLA *DQB1*0602* kandjad. Lisaks on näha, et kolmel HLA *DQB1*0602* markeri kandjal esineb riskialleel A *P2RY11* lookuses homosügootse kandlusega. Ka tuleb välja see, et kolmel geenidoonoril ei esine mitte ühtegi uuritud narkolepsiariski tõstvat markeralleeli. Sellest võiks järeldada, et narkolepsia võib esineda ka nimetatud markerite kandlusest sõltumatult ning haigust võivad esile kutsuda ka teised geneetilised riskifaktorid koostoimes keskkonnateguritega.

Kuna käesolevas töös kasutada olnud patsientide grupp oli selgelt liiga väike ja heterogeenne, siis tuleks saadud tulemustesse suhtuda kui esialgsetesse, mis järgnevates uuringutes võivad muutuda.

2.3.3. Geneetiliste markerite kandlus tervetel doonoritel

Tervetel doonoritel määrati kolme markeri kandlust, mis olid valitud järgnevate kriteeriumide alusel: tag SNP (rs3135388) HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* regioonis võimaldab hinnata *DQB1*0602* haplotüübi kui narkolepsia suhtes kõige suuremat geneetilist riski omava markeri kandlust eestlaste üldpopulatsioonis, *TCRA* lookuses paiknev marker rs1154155 seetõttu, et see on kõige levinum HLA piirkonnast sõltumatu narkolepsiaseoseline polümorfism, antud geenil on roll immuunvastuses ning väidetavalt on narkolepsia autoimmuunsuse taustaga ja võrdlemaks riskialleeli G sagedust narkolepsiahaigetel leitud sagedusega. HLA *DQA2* regiooni markeri rs2858884 puhul on näidatud, et minoorne alleel peaks omama narkolepsia suhtes protektiivset efekti. Kahjuks puudusid Illumina Infinium HumanExome kiibil andmed *P2RY11* lookuses paikneva narkolepsiaseoselise markeri rs2305795 kohta ning selle kandlust tervetel geenidoonoritel ei olnud võimalik hinnata.

HLA *DQB1*0602* kandluse määramiseks tervetel geenidoonoritel kasutati HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* regioonis paiknevat tag SNP-i (rs3135388 G>A; De Bakker jt., 2006). Riskialleeli A sageduseks eestlaste populatsioonis on 0,163. Teadaolevalt varieerub *DQB1*0602* markeri kandlus erinevates populatsioonides vahemikus 12-38% (AASM, 2010). Saadud tulemuste põhjal on umbes 30% (1315/4400) eesti populatsioonist HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* haplotüübi kandjad: 27,2% on HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* heterosügootid ning 2,7% HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* homosügootid. Need tulemused langevad hästi kokku HapMap-CEU referentspopulatsiooniga, kus rs3135388 heterosügootide on 29,2% ning varianthomosügootide 4,4%. Siit võib järeldada, et HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* sagedus eestlaste populatsioonis sarnaneb eurooplaste üldpopulatsioonile ning nimetatud markeriga

eestlaste seas tulevikus läbiviidavate uuringute tulemusi on võimalik võrrelda eurooplaste seas läbiviidavate uuringutulemustega.

TCRA lookuses paikneva narkolepsiaseoselise markeri (rs1154155 T>G) sagedus on antud geenidoonorite hulgas 0,147, seejuures esineb GG riskigenotüüp 2,1% ning GT riskigenotüüp 25% indiviididest. Nagu juba varasemalt mainitud, on HapMap-CEU referentspopulatsioonis riskialleeli G sagedus praktiliselt identne ehk 0,146, ka riskigenotüüpide sagedused on lähedased ehk vastavalt 2,7% ning 23,9%. Varianthomosügootide GG rs1154155 suhtes on 93 ning heterosügootide 1107, kokku 1200 riskialleeli G kandavat doonorit. Kui võtta HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* markeri kandjad, keda on 1315 ja vaadelda, mitmest neil esineb lisaks markeri rs1154155 kandlus, on tulemuseks 348 indiviidi ehk 26,5%. Leitud 119 HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* homosügooti hulgas on narkolepsia eelsoodumusega seostatava markeri rs1154155 homosügootide 1,7% ja heterosügootide 26%. HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* heterosügootide (1196 indiviidi) seas on *TCRA* lookuse riskialleel A suhtes homosügootide 22 ehk 1,8% ning heterosügootide 293 ehk 24,5%. Kirjandusest saadud andmete põhjal suurendab HLA *DQB1*0602* homosügootsus võrreldes heterosügootsusega haigestumise riski 2 korda (Tafti jt., 2014) ja rs1154155 riskialleeli G homosügootsus 2,55 korda võrreldes TT homosügootsusega (Hallmayer jt., 2009), seega vaadeldud indiviidide hulgast oleks antud valimis kahel inimesel teoreetiliselt kõige suurem geneetiline eelsoodumus haigestuda narkolepsiasse.

Protektiivset toimet omava alleeli (rs2858884 A>C) sagedus 4400 indiviidi hulgas on 0,187. Tervete geenidoonorite hulgas on 4% CC homosügootide ning 29,5% AC heterosügootide ja võrreldes HapMap-CEU referentspopulatsiooniga, on sageduste jaotus sarnane, vastavalt siis 0,167; 1,7% ja 30%. HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* homosügootide hulgas leiti protektiivse alleeli kandlus seitsmel ehk 5,9% geenidoonoritest. 9 HLA *DQB1*0602* heterosügooti on homosügootid protektiivse rs2858884 alleeli C suhtes ning hüpoteetiliselt HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* markerist tulenev riski eelsoodumus narkolepsiale võiks olla vähenenud. Ülejäänud HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* heterosügootidest (299) ehk 25% on üks protektiivne alleel, kuid praeguste teadmiste alusel ei ole võimalik selle protektiivse alleeli mõju hinnata, kuna pole teada, kas ta asub *DQB1*0602* positiivsel või negatiivsel alleelil.

Kokkuvõtvalt, käesolev töö on esimene Eestis läbiviidud narkolepsiaseoseliste markerite uuring, mis näitab, et valitud olulisemate riskialleelide esinemissagedus kohalikus üldpopulatsioonis on väga sarnane vastavatele näitajatele eurooplaste üldpopulatsioonis. Markerite rs1154155 ja HLA *DQB1*0602* esinemissageduste erinevusi narkoleptikutest

geenidonorite ning kirjandusest pärit tulemuste vahel ei saa tõepärasena võtta liiga väikese valimi tõttu.

Selleks, et iseloomustada uuritud markerite seost narkolepsiaga, oleks tarvis valimisse kaasata tunduvalt rohkem patsiente. Seejuures on oluline narkolepsia fenotüübi võimalikult detailne kirjeldamine, kuna haiguse geneetiline taust narkolepsia-katapleksia ja lihtsalt narkolepsia korral on ilmselt erinev.

Tänapäeval tehakse narkolepsia diagnoosi kinnitamiseks polüsomnograafilisi uuringuid, et kindlaks määrata narkolepikutele omast unemustrit ning une latentsi pikkust. Narkolepsiaseoseliste suurt riski omavate geneetiliste markerite tuvastamine võiks olla tulevikus täiendavaks diagnostiliseks testiks. Käesolevas töös uuritud 3 põhilist (HLA *DQB1**0602, rs1154155, rs2305795) markerit võivad küll kõik näidata tähendusrikast seost narkolepsiaga, kuid pole teada, millist mõju nad avaldavad koos ja võib-olla leidub veel markereid, mis võivad narkolepsia arengut soodustada või seni tuvastatud riskimarkerite osalust narkolepsia arengus mõjutada.

Uute narkolepsiaseoseliste markerite avastamiseks tuleks läbi viia veel ülegenoomseid assotsiatsiooniuringuid veel suuremate patsientide valimitega. Kui Eestis õnnestuks saada kokku piisavalt suur narkolepikute valim (>100 juba hea), siis oleks võimalus osaleda taolistes uuringutes ja saada seeläbi täiendavaid andmeid eestlastest patsientide kohta. Alternatiivne võimalus oleks moodustada suurem narkolepsiahaigete kohort, kuhu kuuluksid eestlastele lähedased rahvused, näiteks lätlased ja leedukad (Nelis jt., 2009). Viies läbi *case-control* uuringu suurema valimiga, oleks juba võimalik saada statistiliselt olulisi tulemusi.

KOKKUVÕTE

Narkolepsia kui neuroloogiline unehäire on väga kompleksne haigus ning selle konkreetseid tekkepõhjuseid ei ole siiani kindlaks tehtud. Kuigi teatakse, et narkolepsia saab alguse hüpokretiini produtseerivate neuronite hävimisest aju lateraalses osas, siis seni ajani puudub selgus, mis sellist protsessi esile kutsub. Peamine väljapakutud hüpotees viitab autoimmuunsuse mehhanismile, mida toetavad ka narkolepsia uuringutes leitud seosed HLA *DQB1*0602*, rs1154155, rs2305795, rs34593439 ja rs7553711 markeritega.

Antud bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli hinnata TÜ EGV geenidonoritest patsientide (17) hulgas kolme kirjanduses enim esile toodud markerite riskialleelide esinemissagedust. *P2RY11* lookuse markeri rs2305795 alleeli A sagedus langes kokku kirjanduses tooduga, kuid *TCRA* geenis paikneva markeri rs1154155 alleeli G sagedus ning oodatav HLA *DQB1*0602* kandlus (17%) olid võrreldes eeldatavaga väiksemad.

Lisaks leiti, et keskmine vanus narkolepsia diagnoosimise ajal sarnanes Euroopa populatsioonides kirjeldatule. Ka BMI seotus narkolepsiaga on võrreldav eurooplastega, kuna rohkem kui pooltel käesoleva töö valimisse kuulnud narkoleptikutest oli BMI >25. Narkolepsiahaigetel geenidonoritel esines ka varasemalt väljatoodud kaasuvaid haigusi (uneapnoe, rahutute jalgade sündroom, depressioon jne), kuid neid ei saa otseselt seostada narkolepsiaga.

Tervetel TÜ EGV geenidonoritel (4400) uuriti kolme narkolepsiaseoselise markeri kandlust. HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* haplotüüpi iseloomustava rs3135388 G>A kandjasagedus oli 30%, mis sarnanes oodatud sagedusele üldpopulatsioonis. Ka markerite rs1154155 ja rs2858884 minoorsete alleelide sagedused sarnanesid HapMap-CEU referentspopulatsiooniga.

Kokkuvõtteks võib öelda, et saadud tulemuste alusel ei saa teha üldistavaid ning põhjanevaid järeldusi narkolepsia geneetilise eelsoodumuse kohta eestlaste populatsioonis, siiski võiks neid tulemusi arvestada tulevikus läbiviidavates teadusuuringutes, kuhu oleks tarvis kaasata kordades rohkem patsiente. Piisavalt suure valimi jaoks võiks alternatiivina moodustada ka kohordi, kuhu kuuluksid eestlastele geneetiliselt lähedased rahvused, näiteks lätlased ja leedulased ning viia läbi *case-control* uuring suures ühendrühmas, eesmärgiga saada statistiliselt olulisi tulemusi.

Genetic aspects of narcolepsy as a complex disease

SUMMARY

Hanna Rein

Narcolepsy is a chronic sleep disorder which affects quality of life. This disorder is characterized by four major symptoms: excessive daytime sleepiness, cataplexy (brief loss of muscle tone following strong emotion), hypnagogic hallucinations and sleep paralysis. The onset of narcolepsy occurs usually during the adolescence. Narcolepsy is rather under-diagnosed condition with an estimated prevalence ranging from 25 to 50 affected individuals per 100 000.

Several studies have suggested that hypocretin (neuropeptide, that participates in regulation of sleep and wakefulness) deficiency causes narcolepsy in humans and other mammalian species. Because of the association with the specific HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* haplotype, it is proposed that narcolepsy has an autoimmune disease background and it is caused by selective loss of hypocretin producing neurons. Association between immune system and narcolepsy has been strengthened by GWA studies, that connect polymorphisms in immune system genes (*TCRA*, *P2RY11*, *CTSH*, *TNFSF4*, and *DNMT1*) to narcolepsy.

The first aim of this study was to estimate the frequencies of three most important narcolepsy risk alleles described in literature, among 17 narcolepsy patients (gene donors in the Biobank of the Estonian Genome Center). The frequency of marker rs2305795 allele A from *P2RY11* locus was similar to previous studies, however the frequencies of the rs1154155 allele G from *TCRA* locus and HLA *DQB1*0602* were lower than expected.

The mean age of diagnosing narcolepsy was similar to the findings in narcolepsy patients in other European populations. More than half of the Estonian narcolepsy patients had BMI higher than 25, it was similar to the European patients. In addition, Estonian patients had some co-morbid conditions (sleep apnea, restless legs syndrome, depression etc); however, their occurrence is not directly associated with narcolepsy.

Another purpose was to estimate the frequencies of *DRB1*1501-DQB1*0602* haplotype, risk allele of rs1154155 and protective allele of rs2858884 in general population by using 4400 individuals from the Biobank of the Estonian Genome Center. The frequency of marker rs3135388 which describes HLA *DRB1*1501-DQB1*0602* haplotype is similar to general population (30%). Also the frequencies of marker rs1154155 minor allele G and the

protective allele C (rs2858884) near HLA *DQA2* locus were comparable with HapMap-CEU reference population data.

In conclusion, it is impossible to make any major conclusions about genetic predisposition to narcolepsy among Estonians. However, it is possible to use given information for future studies. Since it is unlikely to gather study sample of Estonian patients that is large enough, it could be an alternative to assemble a larger cohort, which comprises of nations that are genetically closely related to Estonians, such as Latvians and Lithuanians to carry out case-control study in order to obtain statistically significant results.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada kõiki inimesi, kes on ühel või teisel moel mind antud töö valmimisel aidanud. Kõige rohkem tänaksin oma juhendajat Maris Teder-Lavingut ning suur tänu ka Viljo Soole, Heidi Saulepile ja Tiit Nikopensiusele suunamise ning abistamise eest.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

Akintomide, G. S., Rickards, H. (2011). Narcolepsy: a review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 7: 507-518.

Aran, A., Lin, L., Nevsimalova, S. jt. (2009). Elevated anti-Streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset. *Sleep*. 32(8): 979-983.

Black, J., Reaven, N. L., Funk, S. E. jt. (2013). High rates of medical comorbidity in narcolepsy: findings from the Burden of Narcolepsy Disease (BOND) study of 9,312 patients in the United States. Presented at the 27th Annual Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, LLC (APSS).

Bonnavion, P., de Lecea, L. (2010). Hypocretins in the control of sleep and wakefulness. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 10: 174-179.

Boulos, M. I., Murray B. J. (2010). Current evaluation and management of excessive daytime sleepiness. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 37: 167-176.

Bours, M. J. L., Swennen, E. L. R., Di Virgilio, F. jt. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. 112(2): 358-404.

Burgess, C. R., Scammell, T. E. (2012). Narcolepsy: neural mechanisms of sleepiness and cataplexy. *The Journal of Neuroscience*. 32(36): 12305-12311.

Chabas, D., Foulon, C., Gonzalez, J. jt. (2007). Eating disorder and metabolism in narcoleptic patients. *Sleep*. 30(10): 1267-1273.

Chabas, D., Taheri, S., Renier, C. jt. (2003). The genetics of narcolepsy. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 4: 459-483.

Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M. jt. (1999). Narcolepsy in *orexin* knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 98: 437-451.

Conus, S., Simon, H. U. (2010). Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Medical Weekly*. 140:w13042: 1-8.

Cvetkovic-Lopes, V., Bayer, L., Dorsaz, S. jt. (2010). Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *Journal of Clinical Investigation*. 120(3): 713-719.

Dauvilliers, Y., Arnulf, I., Mignot, E. (2007). Narcolepsy with cataplexy. *Lancet*. 369: 499-511.

Dauvilliers, Y., Carlander, B., Molinari, N. jt. (2003). Month of birth as a risk factor for narcolepsy. *Sleep*. 26(6): 663-665.

De Bakker, P. I. W., McVean, G., Sabeti, P. C. jt. (2006). A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nature Genetics*. 38(10): 1166-1172.

- De la Herrán-Arita, A. K., García-García, F. (2014). Narcolepsy as an immune-mediated disease. Hindawi Publishing Corporation. Sleep Disorders. 1-6.
- Faraco, J., Lin, L., Kornum, B. R. jt. (2013). ImmunoChip study implicates antigen presentation to T cells in narcolepsy. PLoS Genetics. 9(2): e1003270: 1-7.
- Fontana, A., Gast, H., Reith, W. jt. (2010). Narcolepsy: autoimmunity, effector T cell activation due to infection, or T cell independent, major histocompatibility complex class II induced neuronal loss. Brain. 133: 1300-1311.
- Fugger, L., Steinman, L. (2014). A scientific sequel to Stieg Larsson: relationship between Pandemrix – pandemic influenza vaccine – and the subsequent development of narcolepsy. Editorial comment. Journal of Internal Medicine. 275: 195-197.
- Hallmayer, J., Faraco, J., Lin, L. jt. (2009). Narcolepsy is strongly associated with the TCR alpha locus. Nature Genetics. 41(6): 708-711.
- Han, F., Lin, L., Li, J. jt. (2012a). HLA-DQ association and allele competition in Chinese narcolepsy. Tissue Antigens. 80: 328-335.
- Han, F., Lin, L., Li, J. jt. (2012b). *TCRA*, *P2RY11*, and *CPT1B/CHKB* associations in Chinese narcolepsy. Sleep Medicine. 13(3): 269-272.
- Han, F., Lin, L., Li, J. jt. (2013). Decreased incidence of childhood narcolepsy 2 years after the 2009 H1N1 winter flu pandemic. Annals of Neurology. 73(4): 560.
- Han, F., Lin, L., Warby, S. C. jt. (2011). Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. Annals of Neurology. 70: 410-417.
- Hor, H. (2013). Genome-wide association studies in narcolepsy. The Genetic Basis of Sleep and Sleep Disorders. Cambridge Books Online. Chapter 25: 254-259.
- Hor, H., Kutalik, Z., Dauvilliers, Y. jt. (2010). Genome-wide association study identifies new HLA class II haplotypes strongly protective against narcolepsy. Nature Genetics. 42(9): 786-789.
- Jennum, P., Ibsen, R., Petersen, E. R. jt. (2012). Health, social, and economic consequences of narcolepsy: a controlled national study evaluating the societal effect on patients and their partners. Sleep Medicine. 13: 1086-1093.
- Johns, M. W. (1991). A new method for measuring daytime sleepiness: The Epworth sleepiness scale. Sleep. 14(6): 540-545.
- Josefowicz, S. Z., Wilson, C. B., Rudensky, A. Y. (2009). Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. The Journal of Immunology. 182: 6648-6652.
- Juji, T., Satake, M., Honda, Y. jt. (1984). HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy. All the patients were DR2 positive. Tissue Antigens. 24(5): 316-319.

- Kadotani, H., Faraco, J., Mignot, E. (1998). Genetic studies in the sleep disorder narcolepsy. *Genome Research*. 8: 427-434.
- Kawashima, M., Lin, L., Tanaka, S. jt. (2010). Anti-Tribbles homolog 2 (TRIB2) autoantibodies in narcolepsy are associated with recent onset of cataplexy. *Sleep*. 33(7): 869-874.
- Koepsell, T. D., Longstreth, W. T., Ton, T. G. N. (2010). Medical exposures in youth and the frequency of narcolepsy with cataplexy: a population-based case-control study in genetically predisposed people. *Journal of Sleep Research*. 19: 80-86.
- Kornum, B. R., Kawashima, M., Faraco, J. jt. (2011). Common variants in *P2RY11* are associated with narcolepsy. *Nature Genetics*. 43(1): 66-71.
- Lim, A. S. P., Scammell, T. E. (2010). The trouble with Tribbles: do antibodies against TRIB2 cause narcolepsy? *Sleep*. 33(7): 857-858.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R. jt. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the *hypocretin (orexin) receptor 2* gene. *Cell*. 98: 365-376.
- Longstreth Jr., W. T., Koepsell, T. D., Ton, T. G. jt. (2007). The epidemiology of narcolepsy. *Sleep*. 30(1): 13-26.
- Luca, G., Haba-Rubio, J., Dauvilliers, Y. jt. (2013). Clinical, polysomnographic and genome-wide association analyses of narcolepsy with cataplexy: a European Narcolepsy Network study. *Journal of Sleep Research*. 22: 482-495.
- Mahlis, J., de la Herran-Arita, A. K., Mignot, E. (2013). The autoimmune basis of narcolepsy. *Current Opinion in Neurobiology*. 23: 1-7.
- Mignot, E. J. M. (2012). A practical guide to the therapy of narcolepsy and hypersomnia syndromes. *Neurotherapeutics*. 9: 739-752.
- Mignot, E. (1998). Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*. 50: S16-S22.
- Miyagawa, T., Kawashima, M., Nishida, N. jt. (2008). Variant between *CPT1B* and *CHKB* associated with susceptibility to narcolepsy. *Nature Genetics*. 40(11): 1324-1328.
- Morgenthaler, T. I., Kapur, V. K., Brown, T. M. jt. (2007). Practice parameters for the treatment of narcolepsy and other hypersomnias of central origin. *Sleep*. 30(12): 1705-1711.
- Morrish, E., King, M. A., Smith, I. E. jt. (2004). Factors associated with a delay in the diagnosis of narcolepsy. *Sleep Medicine*. 5: 37-41.
- Nelis, M., Esko, T., Mägi, R. jt. (2009). Genetic structure of Europeans: a view from the North-East. *PLoS ONE*. 4(5): e5472: 1-10.
- Nishino, S., Okura, M., Mignot, E. (2000a). Narcolepsy: genetic predisposition and neuropharmacological mechanisms. *Sleep Medicine Reviews*. 4(1): 57-99.
- Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S. jt. (2000b). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet*. 355: 39-40.

- Nohynek, H., Jokinen, J., Partinen, M. jt. (2012). AS03 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland. *PLoS ONE*. 7(3): e33536: 1-9.
- Okun, M. L., Lin, L., Pelin, Z. jt. (2002). Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups. *Sleep*. 25(1): 27-35.
- Overeem, S., Logan Black, J., Lammers, G. J. (2008). Narcolepsy: immunological aspects. *Sleep Medicine Reviews*. 12(2): 95-107.
- Overeem, S., van Nues, S. J., van der Zande, W. L. jt. (2011). The clinical features of cataplexy: a questionnaire study in narcolepsy patients with and without hypocretin-1 deficiency. *Sleep Medicine*. 12: 12-18.
- Partinen, M., Saarenpää-Heikkilä, O., Ilveskoski, I. jt. (2012). Increased incidence and clinical picture of childhood narcolepsy following the 2009 H1N1 pandemic vaccination campaign in Finland. *PLoS ONE*. 7(3): e33723: 1-9.
- Peacock, J., Benca, R. M. (2010). Narcolepsy: clinical features, co-morbidities & treatment. *The Indian Journal of Medical Research*. 131: 338-349.
- Persson, I., Granath, F., Askling, J. jt. (2014). Risks of neurological and immune-related diseases, including narcolepsy, after vaccination with Pandemrix: a population- and registry-based cohort study with over 2 years of follow-up. *Journal of Internal Medicine*. 275: 172-190.
- Picchioni, D., Mignot, E. J., Harsh, J. R. (2004). The month-of-birth pattern in narcolepsy is moderated by cataplexy severity and may be independent of HLA-DQB1*0602. *Sleep*. 27(8): 1471-1475.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M. jt. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92: 573-585.
- Schenck, C. H., Bassetti, C. L., Arnulf, I. jt. (2007). English translations of the first clinical reports on narcolepsy and cataplexy by Westphal and Gélinau in the late 19th century, with commentary. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 3(3): 301-311.
- Shimada, M., Miyagawa, T., Kawashima, M. (2010). An approach based on a genome-wide association study reveals candidate loci for narcolepsy. *Human Genetics*. 128: 433-441.
- Silber, M. H., Krahn, L. E., Olson, E. J. jt. (2002). The epidemiology of narcolepsy in Olmsted county, Minnesota: a population-based study. *Sleep*. 25(2): 197-202.
- Sonka, K., Susta, M. (2012). Diagnosis and management of central hypersomnias. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 5(5): 297-305.
- Sullivan, S. S., Kushida, C. A. (2008). Multiple sleep latency test and maintenance of wakefulness test. *Chest*. 134: 854-861.

Tafti, M., Hor, H., Dauvilliers, Y. jt. (2014). *DQB1* locus alone explains most of the risk and protection in narcolepsy with cataplexy in Europe. *Sleep*. 37(1): 19-25.

Tafti, M. (2009). Genetic aspects of normal and disturbed sleep. *Sleep Medicine*. 10: S17-S21.

Thannickal, T. C., Moore, R. Y., Nienhuis, R. jt. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*. 27: 469-474.

Thannickal, T. C., Nienhuis, R., Siegel, J. M. (2009). Localized loss of hypocretin (orexin) cells in narcolepsy without cataplexy. *Sleep*. 32(8): 993-998.

Ton, T. G. N., Longstreth Jr. W. T., Koepsell, T. D. (2010). Environmental toxins and risk of narcolepsy among people with HLA DQB1*0602. *Environmental Research*. 110(6): 565-570.

Toyoda, H., Tanaka, S., Miyagawa, T. jt. (2010). Anti-Tribbles homolog 2 autoantibodies in Japanese patients with narcolepsy. *Sleep*. 33(7): 875-878.

Vyse, T. J. (2009). Narcolepsy and the T-cell receptor. *Nature Genetics*. 41(6): 640-641.

Winkelmann, J., Lin, L., Schormair, B. jt. (2012). Mutations in *DNMT1* cause autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness and narcolepsy. *Human Molecular Genetics*. 21(10): 2205-2210.

B) Raamat

American Academy of Sleep Medicine (AASM). 2001. ICSD – The international classification of sleep disorders, revised: diagnostic and coding manual. p. 38-43, 166-169, 300-304. One Westbrook Corporate Center, Suite 920, Westchester, IL 60154-5767, U.S.A.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

¹http://www.ninds.nih.gov/disorders/narcolepsy/detail_narcolepsy.htm

²<http://www3.unil.ch/wpmu/eunn/about-narcolepsy/what-are-the-symptoms-of-narcolepsy/>

³<http://www.sciscogenetics.com/technology/human-leukocyte-antigen-complex/>

⁴<http://bioinfo.ebc.ee/snpmasker/>

⁵<http://primer3.ut.ee/>

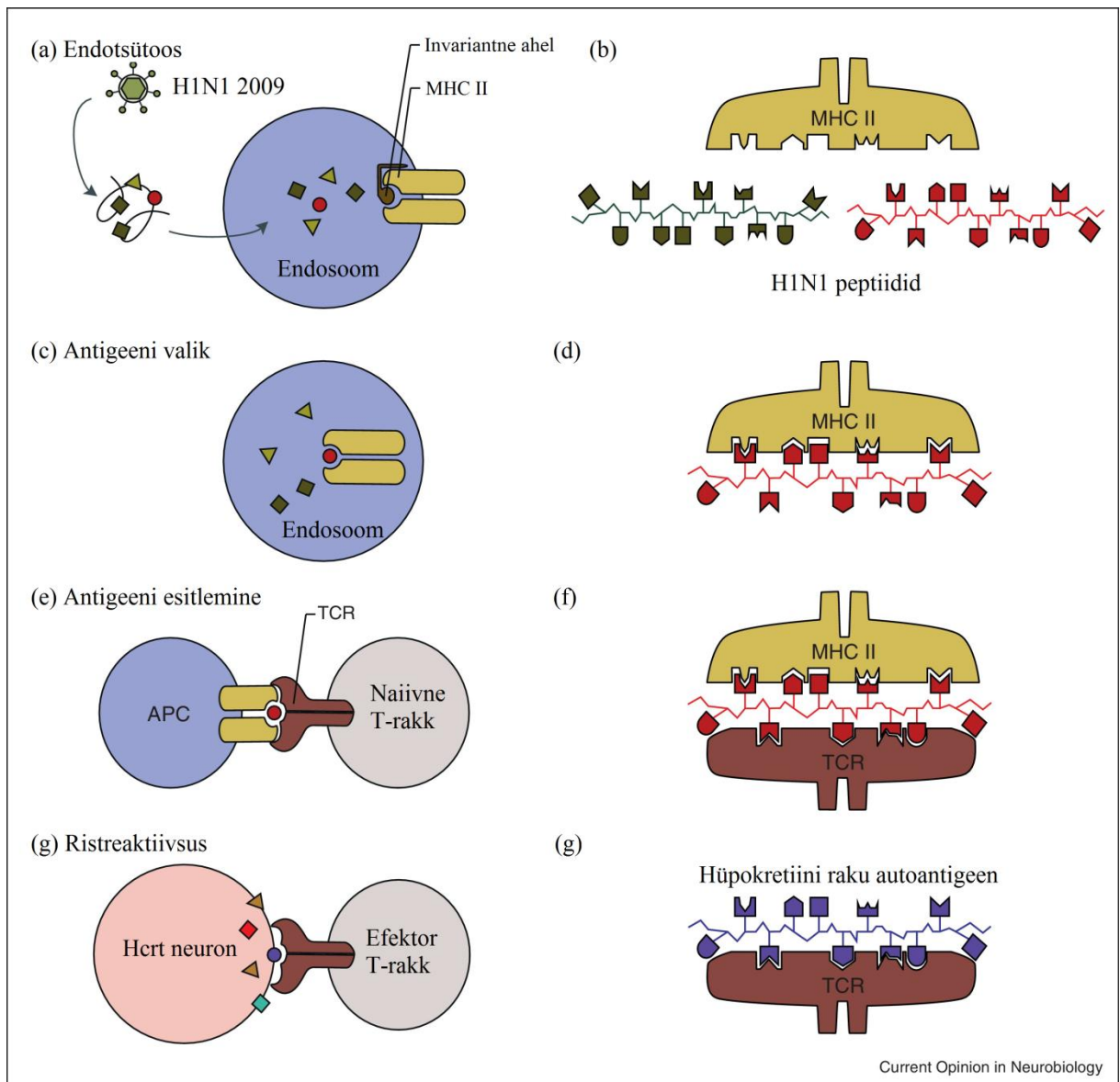
⁶<http://bioinfo.ut.ee/genometester/>

LISAD

Lisa 1. Ülegenoomsetes assotsiatsiooniuuringutes leitud narkolepsiaseoselised ühenukleotiidsed polümorfismid*

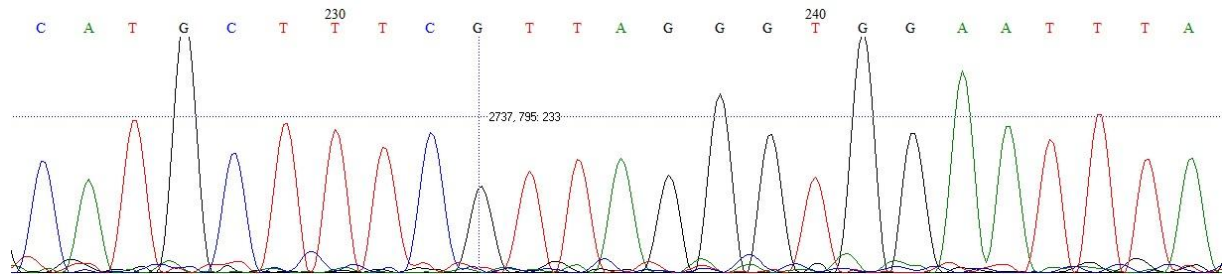
Lookus	Kromosoom	SNP	Riski alleel	Rahvus/ populatsioon	Patsientide/ kontrollide arv	OR (95% CI)	p-väärtus	Seos	Allikas
CPT1B- CHKB	22	rs5770917	C	jaapanlased	n=381/579	1,79 (1,43-2,25)	$4,4 \cdot 10^{-7}$	+	Miyagawa jt., 2008
				eurooplased, põhja- ameeriklased	n=807/1074	0,84 (0,61-1,16)	0,3	-	Hallmayer jt., 2009
TCRA	14	rs1154155	G	eurooplased, põhja- ameeriklased, asiaadid, afroameeriklased	n=1057/1104	1,69 (1,52-1,88)	$2,8 \cdot 10^{-22}$	+	Hallmayer jt., 2009
				eurooplased	n=932/1197	1,54 (1,30-1,95)	$5,3 \cdot 10^{-7}$	+	Hor jt., 2010
				eurooplased, põhja- ameeriklased	n=1886/10 421	1,72 (1,54-1,91)	$8,87 \cdot 10^{-30}$	+	Faraco jt., 2013
P2RY11	19	rs2305795	A	eurooplased, asiaadid, afroameeriklased	n=2522/3167	1,28 (1,19-1,39)	$6,1 \cdot 10^{-10}$	+	Kornum jt., 2011
CTSH	15	rs34593439	A	eurooplased, põhja- ameeriklased	n=1886/10 421	1,34 (1,21-1,46)	$1,78 \cdot 10^{-8}$	+	Faraco jt., 2013
TNFSF4	1	rs7553711	C	eurooplased, põhja- ameeriklased	n=1886/10 421	1,33 (1,18-1,52)	$4,08 \cdot 10^{-8}$	+	Faraco jt., 2013
HLA DQA2	6	rs2858884	C	eurooplased	n=932/1197	1,79 (1,45-2,17)	$2,94 \cdot 10^{-8}$	+	Hor jt., 2010
					n=1218/1399	0,59 (0,50-0,62)	$1,03 \cdot 10^{-9}$	+	Tafti jt., 2014
NFATC2	20	rs8119787	G	jaapanlased	n=212/380	1,45 (1,11-1,90)	0,006	+	Shimada jt., 2010
SCP2	1	rs17107484	A	jaapanlased	n=212/380	1,44 (1,07-1,92)	0,014	+	Shimada jt., 2010
CACNA1C	12	rs10774044	A	jaapanlased	n=212/380	1,51 (1,04-2,19)	0,030	+	Shimada jt., 2010
TCRA/ DAD1	14	rs12588667	C	jaapanlased	n=212/380	1,38 (1,07-1,80)	0,015	+	Shimada jt., 2010
POLE	12	rs4242909	T	jaapanlased	n=212/380	1,40 (1,04-1,88)	0,026	+	Shimada jt., 2010
FAM3D	3	rs753821	A	jaapanlased	n=212/380	1,33 (1,02-1,75)	0,037	+	Shimada jt., 2010

*Kursiivis on ära toodud replikatsiooniuuringu tulemused

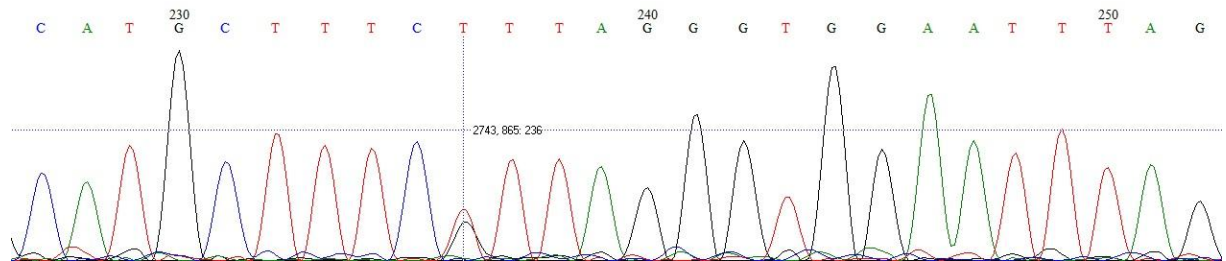


Lisa 2. Molekulaarne mimikri H1N1 peptiidide ja hüpokretiini produtseerivate neuronite autoantigeenide vahel. Molekulaarse mimikri esinemise eelduseks on kehaomase ja võõrpeptiidi järjestuse ja struktuuri homoloogia. (a) APC on „alla neelanud“ H1N1 viiruse ning lõhustanud antigeense materjali endosoomides/lüsoosoomides peptiidseteks fragmentideks. (b) Invariante ahel on lagundatud ning MHC vagu on valmis siduma antigeenset fragmenti. (c,d) MHC siduv vagu selekteerib spetsiifilise aminohappelise järjestuse alusel sobiva H1N1 antigeense fragmendi *DQA1*0102-DQB1*0602* kontekstis. (e) Vesiikulid liiguvad plasmamembraanile ning kompleksi esitletakse APC pinnal T-rakkudele äratundmiseks. (f) TCR tunneb ära spetsiifilise aminohappelise järjestusega peptiidi. (g,h) Aktiveeritud T-rakud annavad ristreaktsiooni hüpokretiini rakkude autoantigeenidega, pidades neid võõrmolekulideks ning põhjustades hüpokretiini tootvate neuronite vastase autoimmuunvastuse (Mahlios jt., 2013, kohandatud).

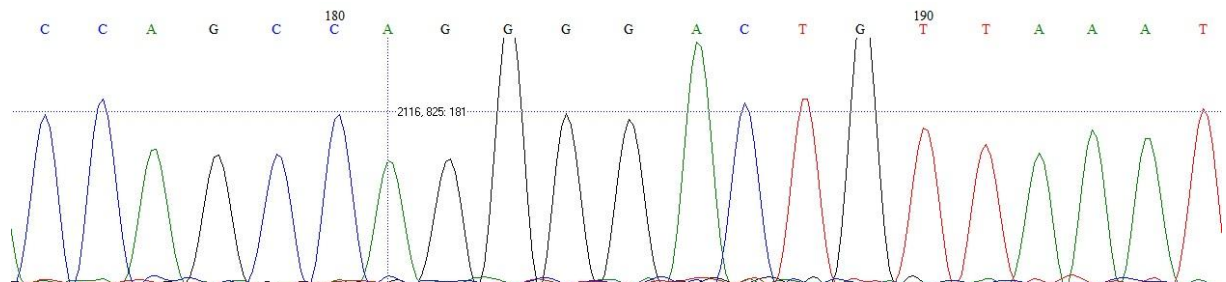
1)



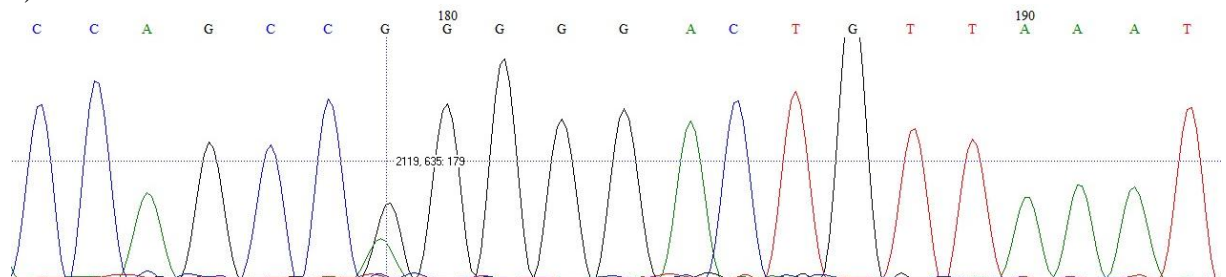
2)



3)



4)



Lisa 3. Sekvencerimistulemuste analüüs programmiga BioEdit versioon 7.2.5. Vertikaaljoonega on märgitud riskialleeli positsioon. 1) rs1154155 homosügoot GG 2) rs1154155 heterosügoot GT 3) rs2305795 homosügoot AA 4) rs2305795 heterosügoot AG

LIHTLITSENTS

Mina Hanna Rein

(sünnikuupäev: 03.06.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Narkolepsia kui komplekshaiguse geneetilised aspektid,

mille juhendaja on Maris Teder-Laving

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 26.05.2014 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014